

Untersuchung zur mikroglialen Aktivierung während der Pathogenese der zerebralen β - Amyloidose in Mausmodellen der Alzheimer Demenz (AD)



Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Jan Stenzel, geb. am 27.09.1977 in Teterow

Rostock, 23.07.2014

Datum der Einreichung: 25.07.2014

Datum der Verteidigung: 05.06.2015

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hubert Bahl, Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Albert-Einstein-Straße 3, 18059 Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Walter, Universität Greifswald, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Ferdinand-Sauerbruch-Straße / Klinikum DZ 7, 17475 Greifswal
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jens Pahnke, Universität Magdeburg, Neurodegeneration Research Lab, Klinik für Neurologie, Leipziger Straße 44, 39120 Magdeburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung.....	8
1. Einleitung.....	9
1.1 Die Alzheimer-Demenz (AD)	9
1.1.1 Historischer Hintergrund.....	9
1.1.2 Epidemiologie.....	9
1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren	10
1.1.4 Neuropathologie der AD.....	13
1.1.5 Neurobiologische Grundlagen der AD	14
1.1.5.1 Amyloid-Ablagerungen	14
1.1.5.2 Neurofibrilläre Bündel	17
1.2 Mikroglia.....	19
1.2.1 Ursprung und Entwicklung.....	19
1.2.2 Funktion	20
1.2.3 Aktivierung von Mikroglia.....	22
1.2.4 Phagozytose von Mikroglia	20
1.3 Mikroglia und Alzheimer-Demenz.....	27
2. Zielstellung	31
3. Material und Methoden	32
3.1 Material	32
3.1.1 Chemikalien	32
3.1.2 Geräte und Hilfsmittel.....	33
3.1.3 Enzyme	34
3.1.4 Kits und Fertiglösungen.....	34
3.1.5 Antikörper.....	35
3.1.5.1 primäre Antikörper	35
3.1.5.2 sekundäre Antikörper.....	35
3.1.6 Primer (Oligonukleotide).....	35
3.1.7 Puffer und Lösungen	35
3.1.8 Mausmodelle.....	37
3.2 Methoden	41
3.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere.....	41

3.2.2 Präparationen des Hirngewebes	42
3.2.3 Immunhistochemie (IHC).....	42
3.2.4 Quantitative Analyse der Mikroglia und A β -Plaques	43
3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung (IF).....	44
3.2.6 Bestimmung der zerebralen A β_{42} - Konzentration mittels ELISA.....	46
3.2.7 Bestimmung der zerebralen ATP-Konzentration.....	47
3.2.8 Präparation der primären Mikroglia.....	47
3.2.9 Messung der A β -Phagozytoseaktivität von primären Mikroglia	48
3.2.10 Isolierung von Knochenmarkzellen	48
3.2.11 Statistische Auswertung	49
4. Ergebnisse.....	50
4.1 Charakterisierung der temporären und spatialen mikroglialen Aktivierung im APP/PS1-C57BL/6J Mausmodell der AD	50
4.2 Einfluss des nukleären genetischen Hintergrundes auf die mikrogliale Aktivierung im Verlauf der AD	55
4.3 Einfluss von somatisch mitochondrialen DNA-Modifikationen auf die mikrogliale Aktivierung im Verlauf bei der AD	65
4.4 Einfluss von mitochondrialen DNA-Modifikationen in den Mikroglia auf deren Aktivierung im Verlauf bei der AD	69
4.4.1 Generierung des APP/PS1-B6xMG ^{mtNOD} Mausmodells.....	69
4.4.2 Charakterisierung des APP/PS1-B6xMG ^{mtNOD} Mausmodells.....	74
5. Diskussion.....	77
6. Literaturverzeichnis	88
7. Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8. Publikationen.....	99
9. Lebenslauf	98
10. Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
ADAM	engl. a disintergrin and metalloprotease
AICD	engl. Amyloid precursor protein intracellular domain
ApoE	Apolipoprotein E
APP	engl. Amyloid precursor protein
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Aβ	β-Amyloid
B6	C57BL/6J-Mausstamm
BACE	engl. beta site APP-cleaving enzyme
bp	Basenpaar(e)
BSA	engl. bovine serum albumin
CD	engl. cluster of differentiation
CDK5	Cyclin-abhängige Kinase 5
COX	Cytochrome C-Oxidase
CRs	engl. complement receptors
ctrl	Kontrolle
CX3CL/ R	engl. Chemokine C-X3-C motif ligand/ receptor
d	engl. day
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotid-5`-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	engl. Enzyme-linked immune sorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FAD	familiäre Alzheimer Demenz
FcRs	Fc-Rezeptoren
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
GM-CSF	engl. granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
GDNF	engl. glia-derived neurotrophic factor
GFP	grün-fluoreszierende Protein
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3β

h	engl. hour
HSCs	engl. hematopoietic stem cells
IBA 1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IDE	engl. Insulin-degrading enzyme
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
KPI	Kunitz Protease Inhibitor
L	Liter
M	Molar
M-CSF	engl. macrophage colony-stimulating factor
mg	Milligramm
mtDNA	mitochondriale DNA
MHC	engl. major histocompatibility complex
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
NEP	Neprilysin
NGF	engl. nerve growth factor
NFT	engl. neurofibrillary tangles
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	engl. nitric oxide
NSAID	engl. nonsteroidal anti-inflammatory drug
OD	optische Dichte
PBS	engl. Phosphate-buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction
PD	engl. Parkinson's Disease
PEN2	engl. Präsenilin enhancer 2
PFA	Paraformaldehyd
PHF	engl. paired helical filaments
PS	Präsenilin
PtdSer	Phosphatidylserin
RIP	regulierte intramembrane Proteolyse

RNase	Ribonuklease
ROS	engl. reactive oxygen species
rpm	engl. rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEM	engl. standard error of the mean
SAD	sporadische Alzheimer Demenz
SRs	engl. Scavenger receptors
std	engl. standard deviation
swe	schwedisch
TGF β	engl. transforming growth factor
TK	Thymidinkinase
TLRs	engl. Toll like receptors
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
U	engl. unit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil je Gesamtvolumen
VD	vaskuläre Demenz
w/v	Massenanteil je Volumenanteil
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Alzheimer-Demenz (AD) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, deren neuropathologischen Merkmale das Auftreten von extrazellulären β -Amyloid ($A\beta$) Ablagerungen, intrazellulären neurofibrillären Tangles sowie der Verlust von Neuronen in verschiedenen Hirnarealen sind. Die in unmittelbarer Nähe der $A\beta$ -Plaques einhergehende Mikrogliose lässt auf eine Involvierung der Mikroglia im Krankheitsverlauf schließen. Jedoch bleibt die genaue Rolle der Mikroglia während der AD-Pathogenese bis heute ungewiss. Aufgrund der Fähigkeit zu Phagozytose von $A\beta$ aber auch einer erhöhten Sekretion an pro-inflammatorischen Faktoren in Verbindung mit ihrer $A\beta$ -vermittelten Aktivierung konnten den Mikroglia sowohl ein neuroprotektiver als auch neurotoxischer Beitrag auf die AD-Pathogenese nachgewiesen werden. Zusammenfassend deutet das auf eine duale Rolle der Mikroglia im Verlauf der Erkrankung hin.

Um die genaue Funktion der Mikroglia während der AD-Progression aufzuklären, wurde in der vorliegenden Arbeit die mikrogliale Aktivierung in Assoziation mit der zunehmenden $A\beta$ -Pathologie in verschiedenen AD-Mausmodellen untersucht. Die vergleichende Analyse von zwei APP/PS1-transgenen Mausinzuchtstämmen zeigte nicht nur, dass die schnelle mikrogliale Akkumulation um die amyloiden Ablagerungen deren Wachstum in der frühen Krankheitsphase beschränkt, sondern offenbarte auch Stamm-spezifische Unterschiede in der mikroglialen Aktivierung. Dieser genetisch bedingte Einfluss auf die mikrogliale Aktivierung war zusätzlich mit einer modulierenden Auswirkung auf die $A\beta$ -Pathologie verbunden. Darüber hinaus konnte durch die Untersuchung eines konplastischen APP/PS1-transgenen Mausmodells mit somatisch spezifischen Veränderungen in der mitochondrialen DNA eine ATP-abhängige erhöhte mikrogliale Aktivierung festgestellt werden, welche die neuroprotektive Rolle der Mikroglia hinsichtlich Plaquebeseitigung/-abbau förderte. Die in diesem Zusammenhang generierten knochenmarkschimären APP/PS1-transgenen Mäuse, bei denen dieselbe spezifische Variation im mitochondrialen Genom nur auf die Mikroglia beschränkt ist, zeigten, dass nicht die intrazelluläre ATP-Konzentration sondern der umgebende zerebrale Energiegehalt eine entscheidende Rolle in der mikroglialen Aktivierung im Verlauf der AD-Pathogenese spielt.

Zusammenfassend unterstützen die gewonnenen Erkenntnisse die Hypothese für einen Wechsel des funktionellen Phänotyps der Mikroglia während der AD-Progression. Eine initial neuroprotektive Funktion der Mikroglia hinsichtlich der Plaquedegradation geht im Verlauf der Erkrankung in eine neurotoxische mikrogliale Reaktion über. Da sowohl der aufgedeckte Einfluss von genetischen Faktoren als auch vom zerebralen ATP-Gehalt auf die mikrogliale Akkumulation in die amyloiden Plaques mit einer veränderten $A\beta$ -Pathologie einhergingen, ist es vorstellbar eine gezielte Mikrogliaaktivierung bei der AD-Erkrankung therapeutisch zu nutzen.

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer Demenz

1.1.1 Historischer Hintergrund

Die Alzheimer Demenz (AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, auf die rund 60% aller auftretenden Demenzfälle weltweit zurückzuführen sind ¹. Sie wurde erstmals 1906 vom deutschen Psychiater, Neurologen und Neuropathologen Alois Alzheimer (1865 - 1915) in seiner Veröffentlichung mit dem Titel „Über eine eigenartige Krankheit der Hirnrinde“ beschrieben ^{2,3}. Darin schilderte er den Fall seiner Patientin Auguste Deter, die 1901 aufgrund auffälliger Eifersuchtsanfälle gegen ihren Mann in die Nervenklinik Frankfurt/Main eingeliefert wurde. Die Patientin wurde in den folgenden fünf Jahren eingehend durch Alois Alzheimer beobachtet. Er stellte bei ihr rasch zunehmende Gedächtnisschwächen, Halluzinationen, Größenwahn, paranoide Ideen, Apraxie sowie Sprach- und Verhaltensstörungen fest. Nachdem Auguste Deter im Jahre 1906 verstarb, obduzierte Alzheimer ihr Gehirn und fand zusätzlich zu einer schweren Atrophie auch Proteinablagerungen im gesamten zerebralen Kortex ⁴. Sie gilt heute als erster dokumentierter Fall der presenilen Demenz. Die heutige offizielle Benennung „Alzheimer-Demenz“ geht auf den Psychiater Emil Kraepelin zurück. Er hat diese Erkrankung in seinem "Lehrbuch der Psychiatrie" von 1910 erstmals nach Alois Alzheimer benannt ⁵.

1.1.2 Epidemiologie

Nach Herz-/Kreislauf-, Tumorerkrankungen und Schlaganfällen ist die AD inzwischen die vierthäufigste Ursache von krankheitsbedingten Todesfällen in den westlichen Ländern ⁶. Nach gemeinsamen Schätzungen von Weltgesundheitsorganisation und *Alzheimer's Disease International* zufolge litten 2010 weltweit 23,7 Millionen Menschen an der Alzheimer Demenz. In Deutschland leben gegenwärtig mehr als 1 Million Menschen, die von der AD betroffen sind. Jahr für Jahr treten fast 200.000 Neuerkrankungen auf. Deutschland liegt damit unter allen Nationen nach der Gesamtzahl der Erkrankten auf dem fünften Platz, übertroffen lediglich von China, den USA, Indien und Japan ²¹⁰.

Es ist allgemein bekannt, dass das zunehmende Alter eine bedeutende Rolle bei der Ausbildung der AD spielt. Liegt die Prävalenz bei den unter 65-jährigen noch bei 1 zu 1000, ist dagegen bei den über 65-jährigen bereits eine Person von 20 an der AD erkrankt ⁷. Ab den 65. Lebensjahr verdoppelt sich das Risiko von der AD betroffen zu sein alle 5,5 Jahre, so dass schätzungsweise fast jeder Zweite über 90 Jahre an der Erkrankung leidet ⁶. Obwohl mehr Frauen als Männer von der AD betroffenen sind, gibt es jedoch keine geschlechts-spezifische Ursache für die Erkrankung. Der beobachtete größere Anteil an Frauen mit AD

liegt in ihrer durchschnittlich höheren Lebenserwartung begründet. Mit zunehmender Lebensspanne erhöht sich auch die Gefahr für Frauen eine AD auszubilden⁸.

Aufgrund der stetig zunehmenden Lebenserwartung und dem damit verbundenen Anstieg der Zahl von über 65-jährigen in den Industrieländern gehen Experten von einer enormen Erhöhung der Alzheimer-Fälle von 81 Mio. Patienten im Jahr 2040 bis zu 115 Mio. im Jahr 2050 weltweit aus^{9,211}. Gelingt kein Durchbruch in Prävention oder Therapie der AD, wird die Erkrankung in naher Zukunft zu einem noch größeren sozialen und gesundheitsökonomischen Problem als sie heute schon darstellt. Neben den psychischen sowie physischen Belastungen der Familienangehörigen bei lang andauernder Pflege von Betroffenen liegen die Kosten laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes bei circa 40.000 Euro pro AD-Patient im Jahr.

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Bei der AD handelt es sich um eine heterogene neurodegenerative Erkrankung, die jedoch klinisch gesehen durch einen irreversiblen fortschreitenden, unaufhaltsamen Verlust des Gedächtnisses und weiterer kognitiver Funktionen (z.B. Orientierung, Sprache) bei den Betroffenen gekennzeichnet ist¹⁰. Nach schleichendem Beginn entwickelt sich die AD langsam aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren. Die allgemeine Prognose für die Überlebenszeit der Patienten beträgt, nach Ausbruch der ersten klinischen Symptome, im Durchschnitt sieben Jahre bei einer relativen großen individuellen Variabilität¹¹. Obwohl gegenwärtig Millionen Menschen weltweit an der AD leiden, ist hinsichtlich ihrer kausalen Entstehung ist bis zum heutigen Zeitpunkt relativ wenig bekannt.

Circa 1% aller auftretenden Fälle der Erkrankungen können der familiären Form der AD (FAD) zugeordnet werden. Diese Fälle sind auf autosomal dominant vererbte Mutationen in wenigstens einem von drei verschiedenen Genen zurückzuführen und durch einen frühzeitigen Krankheitsbeginn noch vor dem 65. Lebensjahr charakterisiert⁶. Zu den Genen zählen das Präsenilin 1-Gen (PS1) auf Chromosom 14, das Präsenilin 2-Gen (PS2) auf Chromosom 1 und das Amyloid-Precursor-Protein-Gen (APP) auf Chromosom 21 in denen Mutation bei insgesamt 404 Familien weltweit bis zum Jahr 2006 identifiziert werden konnten. Den größten Anteil für die Ausbildung einer FAD stellten dabei Mutationen im PS1-Gens dar, die in 315 Familien diagnostiziert wurden. Die in 18 Familien beschriebenen Mutationen des PS2-Gens waren dagegen seltener die Ursache für die auftretenden Fälle der FAD. Mit Mutationen auf dem APP-Gen, welche in 71 Familien festgestellt wurden, waren somit rund 18% der FAD-Erkrankungen verbunden¹². Tatsache ist auch, dass Patienten mit Down-Syndrom, die eine zusätzliche Kopie des Chromosomens 21 besitzen, auf dem sich auch das APP Gen befindet, fast immer eine klassische AD-Pathologie um das 50. Lebensjahr entwickeln. Dieses und die Erkenntnis, dass alle identifizierten Mutationen in

den benannten Genen den Metabolismus des Amyloid-Precursor-Proteins beeinträchtigen, zeigt dass dieses Protein eine zentrale Rolle im Verlauf der AD-Pathogenese einnimmt ^{6,13}.

Im Gegensatz zu der erblich bedingten FAD treten jedoch rund 99% der AD Fälle sporadisch auf und besitzen eine bis heute undefinierte Ätiologie ¹². Die sporadische Form der AD (SAD) ist durch den Ausbruch der Erkrankung nach dem 65.Lebensjahr gekennzeichnet ¹⁴. Obwohl der SAD keine eindeutige Ursache zu zuschreiben ist, zeigten Studien, dass sowohl umweltbedingte als auch genetische Faktoren existieren, die das Risiko an der AD zu erkranken, erhöhen ⁶. Der Hauptrisikofaktor bei der Ausbildung der SAD ist bekanntlich das steigende Alter ⁶. Darüber hinaus wurden bei Patienten mit Herzkrankheiten, Bluthochdruck und Diabetes melitus sowie bei Personen mit früheren Kopfverletzungen oder erlittenem Schleudertrauma ein erhöhtes Risiko für die AD festgestellt. Zusätzlich fördert nachweislich der chronische Missbrauch von Alkohol oder Drogen die Gefahr, an AD zu erkranken ¹⁵. Neben diesen alters- und gesundheitsbedingten Einflüssen gibt es auch genetische Faktoren, die das Risiko für den Ausbruch der AD steigern. Der Polymorphismus des Apolipoprotein E-Gens (ApoE) auf Chromosomen 19 ist bis dato der bedeutendste identifizierte genetische Faktor im Zusammenhang mit der sporadisch auftretenden AD. Vom ApoE-Gen, dessen Protein eine wichtige Rolle als Cholesterin Transporter im Gehirn spielt, gibt es drei Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, aus denen sechs verschiedene Genotypen resultieren. Epidemiologische Studien belegten, dass das ApoE $\epsilon 4$ -Allel dosisabhängig das Risiko für die Ausbildung der Erkrankung erhöht ^{16,17}. Personen mit dem $\epsilon 4$ -Allel des ApoE-Gens waren bis zu viermal häufiger von AD betroffen als Personen mit dem $\epsilon 3$ -Allel, wobei das ApoE2 einen entgegengesetzten Effekt zu scheinen hat und das Krankheitsrisiko vermindert ¹⁸. Die genaue Ursache, warum ApoE4 das Risiko für die AD-Erkrankungen erhöht, ist bis heute jedoch nicht wirklich verstanden.

Allerdings lässt sich aus der Beziehung zwischen dem gesteigerten Krankheitsrisiko und dem Polymorphismus des ApoE-Gens folgern, dass weitere genetische Faktoren in der AD-Ätiologie involviert sind. Obwohl genetische Analysen innerhalb von AD-Patienten Population mehrere Kandidatengene identifizierten, sind die meisten dieser Gene umstritten, weil sie durch andere Studien nicht belegt werden konnten oder nur einen schwachen Einfluss auf das Risiko, eine AD zu entwickeln, hatten ^{19,20}. Auch für die aussichtsreichsten Gene, die mit der AD assoziiert zu sein schienen, konnten Merkmale wie Ausbruch und Progression der Krankheit zwischen Individuen, die die gleiche Genmutation trugen, bedeutend variieren, was die komplexe Natur der AD widerspiegelt ²¹. Aufgrund der genetischen Heterogenität innerhalb der menschlichen Population ist es schwierig, potentielle, für die Ausbildung der AD verantwortliche Gene zu identifizieren. Die Untersuchung des beobachteten Einflusses des genetischen Hintergrundes von AD-transgenen Tiermodellen könnte dazu dienen regulierende genetische Faktoren der AD-Progression zu ermitteln und somit zur

Identifizierung von Genmutationen, die für die kausale Entstehung der Krankheit verantwortlich sein könnten, beitragen²¹.

Da das zunehmende Alter, als Hauptrisikofaktor für die AD, mit reduzierter Energieproduktion bei steigendem Energieumsatz sowie einer erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im neuronalen Gewebe einhergeht, gelangen mitochondriale Dysfunktionen als mögliche Ursache der Erkrankung seit längerem in den Fokus der AD-Forschung^{12,22}. Mitochondrien sind die Hauptenergieproduzenten der Zellen. Neben der ATP-Produktion spielen sie eine wichtige Rolle in der Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) sowie in der Regulation des intrinsischen Apoptose-Signalweges^{23,24}. Eine ausgeglichene Menge an ROS wird benötigt, um deren physiologische Rolle als Signalmolekül in der Zelle aufrecht zu erhalten. Jedoch kann eine Überproduktion an ROS zu zellulären Schäden an verschiedenen Makromolekülen, wie Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren führen, die im Gesamten als oxidativer Stress bekannt sind. Ein Auftreten von oxidativen Stress mit dessen Folgen wurde vermehrt in der Entwicklung sowie im Verlauf der AD-Pathogenese beobachtet²⁵⁻²⁷. Aufgrund der hohen Aktivität der Nervenzellen im Gehirn sind besonders diese auf voll funktionsfähige Mitochondrien angewiesen. Bereits geringste Störungen im Energiemetabolismus können zum Tod der Neurone führen, welches ein Hauptmerkmal der AD darstellt. Im Gehirn von AD-Patienten fand man Hinweise auf eine Dysfunktion der Mitochondrien bereits zu Zeitpunkten noch vor der Entstehung der charakteristischen Neuropathologie der AD-Erkrankung²⁸. Neben einer Erhöhung von Markern des oxidativen Stresses konnten morphologische Veränderungen der Mitochondrien, wie z.B. eine geringere Membranfluidität, die die Energieproduktion negativ beeinträchtigt, aufgezeigt werden^{29,30}. Darüber hinaus wurde in den Mitochondrien von AD-Betroffenen eine bedeutende Reduktion der Cytochrome C-Oxidase (COX) festgestellt, welche mit den neuronalen Gewebeschädigungen in Zusammenhang gebracht wird³¹. Angesichts dieser Erkenntnisse lässt sich eine direkte Beziehung zwischen mitochondrialer Funktion und AD-Erkrankung vermuten, jedoch muss noch geklärt werden, ob mitochondriale Dysfunktionen in der Entstehung der AD involviert sind oder nur eine Folge der auftretenden Neurodegeneration darstellen.

In Anbetracht der nur wenigen Fälle der FAD geht man von einer komplexen Ätiologie der sporadisch auftretenden Form der AD aus. Inzwischen besteht generell die Meinung, dass die kausale Entstehung der SAD nicht einen einzigen Grund besitzt, sondern durch Wechselwirkungen zwischen genetischen- sowie Umweltfaktoren bedingt ist. Neben den beschriebenen Risikofaktoren gibt es jedoch auch Einflüsse, die die Gefahr für eine Entwicklung der AD-Erkrankung minimieren können: dazu zählen regelmäßige Bewegung³², höhere Bildung³³ und gesunde Ernährung³⁴.

1.1.4 Neuropathologie der AD

Die AD ist eine Erkrankung des Gehirns von der hauptsächlich die Regionen des Neokortex, des Hippocampus sowie der Amygdala betroffen sind ⁶. Wie für fast alle neurodegenerativen Erkrankungen typisch, ist auch die AD durch den progressiven, unaufhaltsamen Niedergang von Nervenzellenpopulationen im Kortex gekennzeichnet ^{35,36}. Der Zellverlust führt zu einer ausgeprägten zerebralen Atrophie mit Schrumpfung der Hirnrinde und dadurch bedingter Erweiterung der Sulci und Ventrikel, die vor allem den medialen Temporallappen mit dem Hippocampus betrifft, gefolgt von Parietal- und Frontallappen (Abb.: 1A) ²⁰⁸. Mikroskopisch ist die AD sowohl durch das Auftreten von extrazellulären Ablagerungen des β -Amyloid ($A\beta$) Proteins in Form von $A\beta$ -Plaques (Abb.: 1B) als auch durch intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (Tangles) aus hyperphosphorylierten Tau (τ) Protein in Neuronen des zerebralen Kortex charakterisiert (Abb.: 1C) ³⁷. Neben diesen gemeinsam vorkommenden Proteinablagerungen kommt es bei der AD gehäuft zur zerebralen Amyloidangiopathie, bei der sich extrazelluläre $A\beta$ -Peptide in Blutgefäßen akkumulieren (Abb.: 1D) ³⁸. Des Weiteren finden sich in der Umgebung der $A\beta$ -Plaques reaktive Mikroglia, bei denen es sich um Zellen der monozytären Linie mit phagozytierender Funktion handelt sowie eine Proliferation von Astrozyten ³⁹.

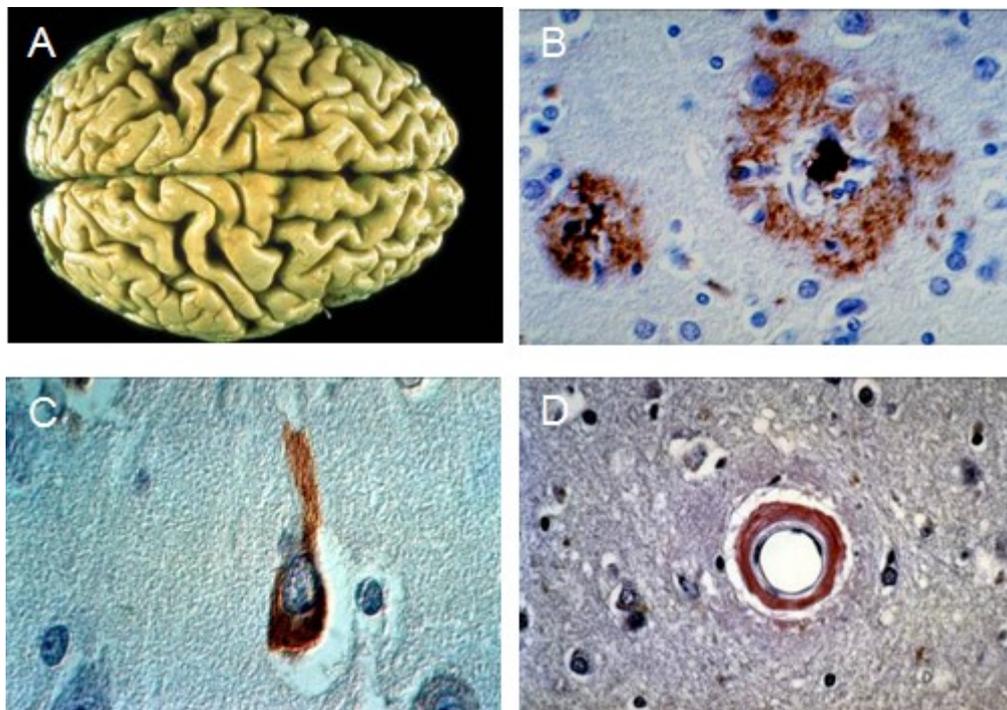


Abb. 1: Darstellung der charakteristischen neuropathologischen Merkmale der AD. A) Hirnatrophie mit Abnahme der Breite der Hirnwindungen (Gyri) und Zunahme der Größe der Hirnfurchen (Sulci). B) extrazelluläre β -Amyloid Ablagerungen ($A\beta$ -Plaques), C) intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (Tangles). D) Blutgefäßablagerungen von β -Amyloid (entnommen aus ²⁰⁹).

1.1.5 Neurobiologische Grundlagen der AD

1.1.5.1 Amyloid-Ablagerungen

Die abnormale erhöhte Entstehung von extrazellulären amyloiden Ablagerungen im Gehirn von AD-Patienten gilt als prominentes neuropathologisches Merkmal der Erkrankung. Diese sogenannten A β -Plaques bestehen überwiegend aus unlöslichen, im Durchmesser 6-10 nm großen amyloiden Fibrillen, die sich aus aggregierten A β -Peptiden zusammensetzen⁴⁰⁻⁴². Histomorphologisch sind A β -Plaques dadurch charakterisiert, dass sich in ihrer unmittelbaren Nähe dystrophe Dendriten und Axone sowie aktivierte Mikroglia und proliferierende Astrozyten befinden⁴³. Zahlreiche Studien sehen in der Bildung der A β -Plaques ein primäres Ereignis in der pathologischen Kaskade der AD und formulierten daraus die "Amyloid-Hypothese". In dieser These wird davon ausgegangen, dass die Produktion sowie Aggregation von A β -Peptiden mit dem finalen Stadium der Plaquebildung die Ursache und nicht die Folge des Neuronensterbens im Verlauf der AD-Pathogenese darstellt⁴⁴. Die bewiesene Toxizität von A β -Peptiden und ihrer Aggregate gegenüber Nervenzellen sowie die erhöhte Freisetzung von A β durch Zellen, die mutierte Gene der FAD tragen als auch die Tatsache, dass eine A β -Akkumulation der Bildung von neurofibrillären Bündel vorausgeht, sind bedeutende Fakten, auf die diese Annahme basiert^{45,46}.

Eine zentrale Rolle in der "Amyloid-Hypothese" nimmt das APP ein, aus dem der Hauptbestandteil der A β -Plaques, das etwa 4 kDa große A β -Peptid hervorgeht⁴⁷. Das APP gehört zu der Familie der konservierten, glykosylierten Typ I integralen Membranproteine und wird in Säugetieren stark in den Neuronen des Gehirns exprimiert. APP ist aber auch in Zellen der meisten anderen Gewebe zu finden^{48,49}. Vom humanen APP existieren mehrere Isoformen mit einer Größe zwischen 365 und 770 Aminosäuren (AS), die aufgrund alternativen Spleißens entstehen. Die drei Hauptvarianten des Spleißens besitzen 695 AS (APP₆₉₅), 751 AS (APP₇₅₁) bzw. 770 AS (APP₇₇₀). APP₇₅₁ und APP₇₇₀ enthalten im Gegensatz zu APP₆₉₅ eine Kunitz-Protease-Inhibitor (KPI)-homologe Aminosäuresequenz in der Nähe ihres N-Terminus und werden in fast allen Geweben exprimiert. Die Expression von APP₆₉₅ hingegen erfolgt vornehmlich in den Nervenzellen und stellt somit die hauptsächliche neuronale Isoform des APPs im Menschen dar^{50,51}. Der Grund sowie die funktionelle Bedeutung für das gewebsspezifische alternative Spleißen sind bis dato noch unverstanden⁵². APP in vollständiger Größe besteht aus drei Domänen: einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (ECD), die etwa 85% der gesamten Proteinmasse ausmacht, einer einzeln durchspannenden Transmembrandomäne (TM) und einer kleinen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (ICD) (Abb.: 2a)⁵³. Das APP ist nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums,

des Golgi-Apparates sowie von Endosomen und Mitochondrien nachweisbar, bei dem sich die ECD im Lumen dieser intrazellulären Vesikel befindet⁵⁴. Die 38-43 AS lange Sequenz des A β , aus deren Aggregate sich die amyloiden Plaques bilden, ist beginnend mit ihrem N-terminalen Ende in der extrazellulären Domäne bis hin in die Transmembrandomäne lokalisiert⁵⁵. Es gibt einige Untersuchungen, die eine Involvierung von APP in der neuronalen Entwicklung, Synaptogenese und der synaptischen Plastizität andeuten, allerdings ist die exakte Funktion des APPs bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt⁵⁶⁻⁵⁸. Aufgrund der teilweisen Lokalisation auf der Plasmamembran und der Analogie des APPs in der Sekundärstruktur zum Notch-Rezeptor wird dem APP auch eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor zugewiesen, indem es über Bindung von extrazellulären Liganden an ihrer ECD, Signale über das C-terminales Ende in die Zelle transduziert⁵⁹. Darüber hinaus wird dem APP eine zusätzliche Rolle in der Zell-Zell-Interaktionen zugesprochen, da sich die ECD aus mehreren Unterdomänen zusammensetzt, die zum Teil mit anderen extrazellulären Matrixmolekülen oder Oberflächenrezeptoren interagieren können⁶⁰. Andere mit dem APP in Zusammenhang gebrachte Eigenschaften, wie synaptotrophische, neuroprotektive- als auch neurotoxische Wirkungen, gehen auf Fragmente zurück, die bei der proteolytischen Prozessierung des APPs entstehen^{57,61-63}.

Das APP durchläuft in seiner Entwicklung den konstitutiven sekretorischen Stoffwechselweg. Im Verlauf der Sekretion als auch nach Einbau in die Zielmembran wird das APP durch Glykosylierung und Phosphorylierung posttranslational modifiziert sowie prozessiert³⁷. Die Prozessierung des APPs kann dabei auf zwei Wegen erfolgen, die entweder zur Bildung von nicht amyloiden Fragmenten oder zur Produktion von A β -Peptiden führen (Abb.: 2)⁴⁷. Im gesunden humanen Gehirn werden über 90% des APPs über den sogenannten Weg der nicht-amyloiden Prozessierung verarbeitet. Bei dieser Verstoffwechslung wird das APP endoproteolytisch durch die α -Sekretase, an der 83. AS ausgehend vom C-Terminus innerhalb der A β -Domäne geschnitten. Während zunächst vermutet wurde, dass mehrere Proteasen, insbesondere die Mitglieder der Disintegrin- und Metalloproteasen- (ADAM, engl. disintegrin and metalloprotease) Familie einschließlich ADAM9, ADAM10 and ADAM17 als α -Sekretase fungieren können, belegten kürzlich erschienene Studien, dass hauptsächlich ADAM10 die α -Sekretase Aktivität besitzt^{64,65}. Die Spaltung des APPs durch die α -Sekretase resultiert in der Freisetzung eines großen löslichen neuroprotektiv wirkenden extrazellulären Fragments (sAPP α) und einem kurzen membrangebunden C-terminalen Fragment (C83) mit einer Länge von 83 AS. Letztere kann in der Transmembrandomäne in einem als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) definierten Prozess durch die γ -Sekretase gespalten werden. Dieser Schritt führt zur Generierung der intrazellulären Amyloid-Domäne (AICD, engl. Amyloid Precursor Protein intracellular domain) und eines kleinen 3kDa großen Peptids (P3) (Abb.:2b)⁵⁵. Die AICD

steht im Zentrum eines komplexen Netzwerkes von Protein-Protein Wechselwirkungen, dessen funktionelle Relevanz sehr umstritten ist und von Genregulation bis hin zu induzierter Apoptose reicht^{66,67}. Bei der γ -Sekretase, einer speziellen Aspartylprotease, handelt es sich um ein Multienzymkomplex, bestehend aus Präsenilin 1 (PS1) oder 2 (PS2), Nicastrin, APH1 (engl. anterior pharynx defective 1) und PEN2 (engl. presenilin enhancer 2), dessen aktives Zentrum innerhalb der Präsenilin-Komponente lokalisiert ist^{68,69}. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird aufgrund der Zerstörung der A β -Sequenz durch die α -Sekretase die Bildung von A β -Peptiden und somit die Entstehung von amyloiden Ablagerungen verhindert (Abb.: 2b)⁷⁰.

Unter pathologischen Bedingungen durchläuft der Großteil des APPs jedoch den alternativen Weg der amyloidogenen Prozessierung, bei dem es zur Produktion von A β -Peptiden kommt und damit die Grundlage für die Entstehung der charakteristischen Plaques bei der AD bildet³⁷. In diesem Fall wird das APP im ersten Schritt nicht durch die α -Sekretase, sondern durch die β -Sekretase geschnitten. Die neuronale β -Sekretase, auch bezeichnet als BACE1 (engl. beta-site APP-cleaving enzyme), ist eine Transmembran-Aspartylprotease, die das APP exakt am N-Terminus der A β -Aminosäuresequenz spaltet, was zur Sekretion eines großen löslichen extrazellulären Fragments (sAPP β) und eines 99 AS langen membrangebunden C-terminalen Teils (C99) führt (Abb.:2c)^{71,72}. sAPP β besitzt genau wie das sAPP α eine neuroprotektive Funktion, kann allerdings durch weitere enzymatische Spaltung in Bruchstücke umgewandelt werden, die eine Axondegeneration vermitteln können⁷³. Das C99 Fragment wird anschließend wiederum durch die γ -Sekretase innerhalb der Membran geschnitten und resultiert in diesem Fall in der Freisetzung des A β -Peptids sowie der wasserlöslichen ACID Domäne (Abb.: 2c). Aufgrund der unspezifischen Spaltung der γ -Sekretase entstehen im Verlauf der RIP heterogene A β -Fragmente, die eine Länge von 38, 40, 42 oder 43 AS besitzen können. Unter den gebildeten A β -Peptiden ist die Variante mit 40 AS (A β_{40}) die häufigste. Nur rund 10% der A β -Peptide weisen eine Länge von 42 AS (A β_{42}) auf. Jedoch tendiert das längere und hydrophobere A β_{42} eher zur Bildung von Dimeren, Oligomeren bis hin zu Fibrillen als A β_{40} und stellt damit die Hauptspezies der amyloiden Plaques bei der AD dar⁷⁴.

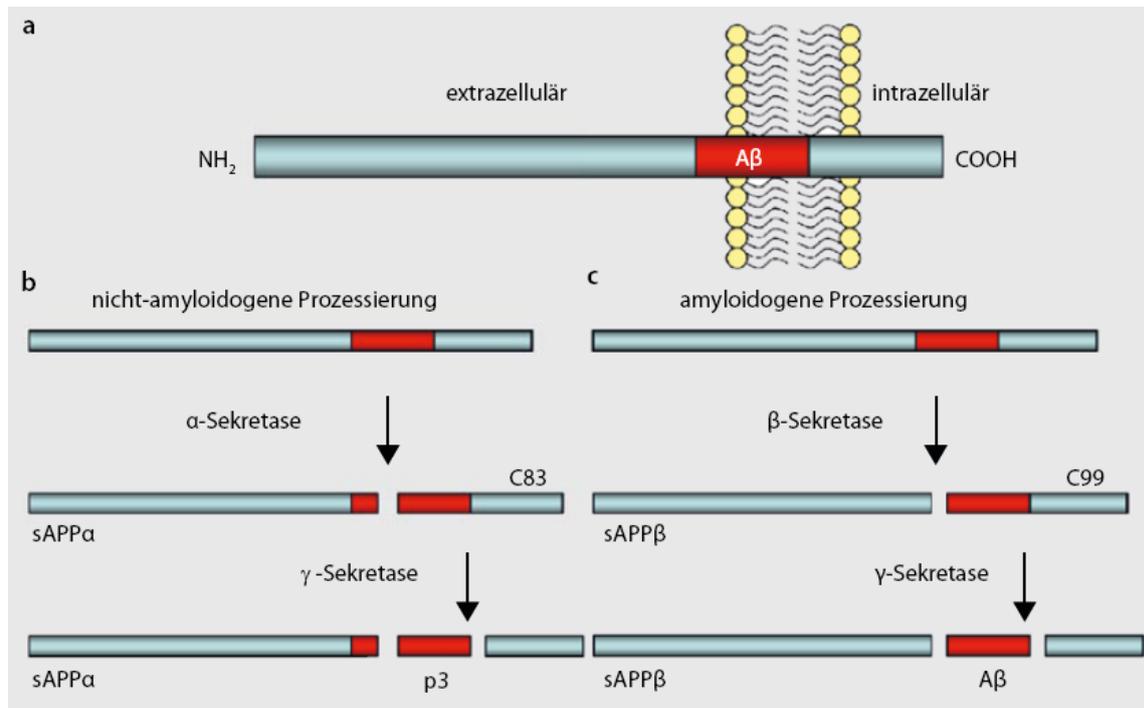


Abb. 2: Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP).

a) Struktur und Ausrichtung von APP in der Zellmembran, b) nicht amyloidogene Prozessierung des APPs durch α - und γ -Sekretasen ohne Bildung von A β , c) amyloidogene Prozessierung von APP durch β - und γ -Sekretasen mit der Entstehung von A β (entnommen aus ⁷⁵).

In der AD-Pathologie wird zwischen zwei Plaquetypen unterschieden, den neuritischen und den diffusen Plaques. Die neuritischen Plaques bestehen aus einem Kern aus unlöslichen aggregierten A β -Fibrillen, der in seiner unmittelbaren Nähe mit nicht-fibrillären Polymeren von A β -Peptiden assoziiert ist. Neuritische Plaques stehen immer in Verbindung mit lokalen Immunreaktionen. Im Gegensatz dazu sind in der Umgebung von diffusen Ablagerungen keine Entzündungsreaktionen zu beobachten. Diese diffusen Plaques setzen sich morphologisch gesehen hauptsächlich aus nicht-fibrillären A β -Polymeren zusammen ⁷⁶. Interessanterweise zeigen sich solche diffusen amyloiden Ablagerungen auch im Gehirn von gesunden Individuen ohne mentale Auffälligkeiten ^{77,78}.

1.1.5.2 Neurofibrilläre Bündel

Neben den amyloiden Ablagerungen ist das Auftreten von intrazellulären Proteinablagerungen, die als neurofibrilläre Bündel (NTFs, engl. neurofibrillary tangles) bezeichnet werden, das zweite klassische zytopathologische Merkmal der AD ⁷⁹. Die bei der Erkrankung überwiegend in den neuronalen Zellkörpern und Axonen des Kortex sowie des limbischen Systems vorkommenden NTFs bestehen aus großen nicht membrangebunden Anhäufungen von gepaarten helikalen Proteinfilamenten (PHF, engl. paired helical filament) ^{80,81}. Durch

intensive Forschung konnte nachgewiesen, werden das sich die PHFs hauptsächlich aus unlöslichen, hitzestabilen Polymeren des Tau (τ)-Proteins, eines Mikrotubuli-assoziierten Proteins zusammensetzen ⁷⁹. Das Tau-Protein bildet in sich eine Gruppe von alternativ gespleißten zytoplasmatischen Proteinen, die alle eine Mikrotubuli-Bindungsdomänen (MTBR, engl. microtubule binding domain region) besitzen, welche entweder aus drei oder vier Tandem-Wiederholungs-Motiven (TRM, engl. Tandem repeat motifs) besteht ⁸². Im Normalfall ist das Tau beim Aufbau, der Stabilisierung sowie bei der Quervernetzung der Mikrotubuli involviert ⁸¹. Diese Funktionen des Tau-Proteins werden durch dessen Bindung an die Mikrotubuli vermittelt, bei der die Phosphorylierung von bestimmten Serin- und Theroninresten innerhalb ihrer MTBR durch spezielle Kinasen, wie z.B. der Cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK5) sowie der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β), eine wichtige Rolle spielt ^{82,83}.

In den Gehirnen von AD-Patienten kommt es jedoch in der MTBR der Tau-Proteine zu einer unspezifischen Phosphorylierung von mehreren Serin- und Theroninresten. Diese Hyperphosphorylierung zerstört bzw. vermindert die Affinität des Taus zu den Mikrotubulis und induziert stattdessen eine Selbstaggregation der τ -Proteine, die über die Bildung von PHFs, in der Entstehung der neurofibrillären Bündel resultiert ^{84 85}. Die damit verbundene Neurodegeneration wird dadurch hervorgerufen, dass NFTs beinhaltende Neuronen, aufgrund einer Vielzahl von zellulären Abnormitäten einschließlich der Störung der Autophagie, des intrazellulären Vesikeltransportes sowie der neuronalen Polarität, absterben ^{86 82}.

Über das Zusammenspiel von amyloiden Ablagerungen und Tau-Aggregaten in Form von NFTs ist bis heute nur relativ wenig bekannt. Die Tatsache, dass Mutationen im Tau-Gen zur Bildung von NFTs aber nicht zur Entstehung von A β -Plaques führen, dagegen jedoch Mutationen im APP-Gen oder den PS-Genen in der Entwicklung sowohl von Plaques als auch NFTs resultieren, unterstützt die "Amyloid-Hypothese", die besagt, dass die A β -Pathologie der erste Schritt zur Entstehung der Alzheimer Erkrankung ist ⁵⁵. Alle anderen Erscheinungen, inklusive dem Auftreten von NFTs, sind dieser Hypothese zufolge als sekundär anzusehen. Der Fakt, dass eine Reihe von Nicht-Alzheimer-Erkrankungen wie z.B. Morbus Pick und die Silberkornkrankheit ausschließlich durch das Vorhandensein von abnorm phosphoryliertem Tau-Proteinen gekennzeichnet sind, beweist jedoch, dass Tau-Ablagerungen an sich für die Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen, die als Tauopathien bezeichnet werden, ausreichend sind ^{87,208}.

1.2 Mikroglia

Obwohl die Entdeckung der Mikroglia auf F. Nissl und F. Roberston zurückzuführen ist, wurden diese Zellen erstmals von spanischen Neuroanatomen Pio del Rio-Hortega im Detail untersucht. Mit seiner 1932 veröffentlichten Studie gilt er heute als „Vater der Mikroglia-Biologie“. Viele seiner Erkenntnisse über Ursprung, Morphologie und Funktion der Mikroglia sind heute noch relevant und dienen als Grundlage für weitere Untersuchungen ⁸⁸.

Mikroglia sind die residenten Gewebsmakrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie machen circa 10-15% der gesamten Zellpopulation des ZNS aus und gehören wie Astrozyten und Oligodendrozyten zu den Gliazelltypen ⁸⁹. Im ZNS sind Mikroglia an der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beteiligt und spielen als immunokompetente und phagozytierende Zellen eine wichtige Rolle bei Verletzungen und Erkrankungen ⁹⁰.

1.2.1 Ursprung und Entwicklung

Trotz intensiver Forschung war der Ursprung der Mikroglia Gegenstand kontroverser Diskussionen in den letzten Jahrzehnten. Mittlerweile besteht jedoch ein allgemeiner Konsens, dass Mikroglia, im Gegensatz zum neuroektodermalen Ursprung von Astrozyten und Oligodendrozyten, aus Vorläuferzellen des mesodermalen (myeloiden) Gewebes hervorgehen, die das ZNS während der Entwicklung infiltrieren ⁹⁰.

Die Besiedlung des ZNS mit Mikroglia erfolgt dabei in zwei Phasen ⁹¹. In der ersten Phase, im Verlauf der embryonalen Entwicklung, gelangen mikrogliale Vorläuferzellen des Dottersacks in das sich entwickelnde ZNS und differenzieren dort zu Mikroglia ⁹². In der zweiten Phase, während der frühen postnatalen Periode, wandern Monozyten, die im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) gebildet wurden, über das Blutssystem in das zentrale Nervensystem ein, wo sie eine Differenzierung zu Mikroglia durchlaufen ⁹³.

Zu Beginn der Differenzierung haben alle eingewanderten Mikroglia eine amöboide Gestalt mit nahezu keinen Zellausläufern. Mit dieser lediglich mit wenig und kurzen Fortsätzen ausgestatteten Form sind sie in der Lage, sich frei im neuronalen Gewebe zu bewegen ⁹⁴. Zusätzlich besitzen Mikroglia in dieser Phase ihrer Entwicklung die Fähigkeit zur Phagozytose, aufgrund der sie eine wichtige Rolle während der Entwicklung des Gehirns spielen, indem sie die durch programmierten Zelltod selektierte Nervenzellen entfernen ^{95,96}. Nachdem die freibeweglichen amöboiden Mikroglia ihre finale Position im ZNS erreicht haben, verändern sie ihre Morphologie. Der Zellkörper wird stark zu einer bipolaren Form reduziert. Es kommt zur Ausbildung von weit verzweigten Zellausläufern, die sich über ein Gebiet von bis zu 100 µm erstrecken können ⁹⁷. Dabei nehmen einige dieser Zellverzweigungen direkten Kontakt mit umliegenden Neuronen, Astrozyten und Blutgefäßen

auf ⁹⁸. Durch diesen Entwicklungsschritt verlieren die Mikroglia ihre migratorische sowie phagozytierende Eigenschaft und werden als „ruhende“ Mikroglia bezeichnet. In *in vitro* Studien haben gezeigt, dass die Umwandlung von amöboiden zu ruhenden Mikroglia durch von Astrozyten abgegebene Zytokinen, wie dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β , engl. transforming growth factor- β), dem Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF, engl. macrophage colony-stimulating factor) und dem Granulozyten/Makrophagen-stimulierenden Faktor (GM-CSF, engl. granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), ausgelöst werden kann ⁹⁵. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einer Astrozyten-Mikroglia-Interaktion eine wichtige Rolle in der Mikroglia-Biologie zukommt.

Am Ende der Entwicklung sind somit alle Regionen des ZNS inklusive des Gehirns mit ruhenden Mikroglia besiedelt. Die Aufrechterhaltung einer stabilen Mikroglia-Population erfolgt im adulten ZNS durch intrinsische Proliferation und durch die Einwanderung von zirkulierenden Blutmonozyten aus dem Knochenmark ^{86,96}. Im gesunden, erwachsenen Gehirn ist die „Turnover“ (Austauschs-) Rate von Mikroglia allerdings so sehr gering, dass die Erneuerung durch eingewanderten Monozyten nahezu vernachlässigbar ist ^{97,98}. Unter pathologischen Bedingungen jedoch kann es zu einem massiven Eindringen von knochenmarksabgeleiteten Monozyten kommen, die einen großen Teil der Mikroglia im ZNS ersetzen ⁹⁹⁻¹⁰¹.

1.2.2 Funktion

Im gesunden adulten ZNS, einschließlich des Gehirns, sind ruhende Mikroglia gleichmäßig verteilt. Dieser in seiner Morphologie weit verzweigte Phänotyp der Mikroglia weist nur eine begrenzte Expression von Molekülen auf, die mit der allgemeinen Makrophagenfunktion assoziiert sind ⁹⁰. Im Gegensatz zu ihrer Bezeichnung sind ruhende Mikroglia jedoch nicht untätig. Untersuchungen basierend auf der *in vivo* 2-Photonen-Mikroskopie zeigten, dass die Zellverzweigungen der ruhenden Mikroglia sehr beweglich sind. Durch diese Mobilität in ihren Verzweigungen scannen die ruhenden Mikroglia ständig ihre Umgebung und übernehmen die Überwachung der Gewebehomöostase. Dabei kontrollieren sie, ausgestattet mit einer Vielzahl an Oberflächenrezeptoren, Konzentrationsänderungen von endogenen Substanzen, welche von benachbarten Astrozyten und Neuronen ausgeschüttet werden, sowie das Vorhandensein von exogenen Stoffen ⁹⁸. Zusätzlich zur Homöostaseüberwachung produzieren die ruhenden Mikroglia diversere neurotrophe Faktoren, wie z.B. Interleukin-1 (IL-1) und IL-3 und den Nervenwachstumsfaktor (NGF, engl. nerve growth factor) und unterstützen dadurch die umliegenden Neurone ^{99,100}.

Unter pathologischen Bedingungen, wie Verletzung und Infektion des ZNS durch Viren, Bakterien oder Pilze sowie bei Erkrankungen, Schlaganfällen und Tumoren, registrieren die

ruhenden Mikroglia eine gestörte Gewebemöostase und werden aktiviert. Im Verlauf der Aktivierung unterlaufen ruhende Mikroglia, eine dramatische morphologische Veränderung. Die weit verzweigten Zellfortsätze werden stark reduziert und es kommt zu einer Vergrößerung des Zellsomas bis hin zu einer amöboiden Form ¹⁰¹. Zusätzlich erfolgt die Expression von weiteren Zelloberflächenrezeptoren und einer Reihe von Effektormolekülen, die mit typischen Funktionen von Makrophagen einschließlich der Phagozytoseaktivität verbunden sind. Durch diese Veränderungen in Morphologie, Genexpression und funktionellen Phänotyp können die Mikroglia spezifisch auf die jeweilige pathologische Situation reagieren. Im aktivierten Zustand sind Mikroglia wiederum mobil und bewegen sich chemotaxisch gesteuert in Richtung Läsion oder Infektionsherd ¹⁰². Es wird vermutet, dass dabei extrazelluläres Adenosintriophosphat (ATP) durch verletzte Astrozyten und Neurone abgegeben wird und damit eine wichtige Rolle als chemotaxischer Gradient in der Bewegung der Mikroglia spielt ^{103,104}. Zum Ort des pathologischen Geschehens migrierte Mikroglia können eine Vielzahl von Maßnahmen einleiten, um weitere Schäden zu begrenzen und zur Wiederherstellung der normalen Gewebemöostase beizutragen. Dabei sind aktivierte Mikroglia zur Proliferation fähig. Der Vorgang, der die lokale Mikroglia-dichte an der Verletzung bzw. Infektion erhöht, wird als reaktive Mikrogliose bezeichnet ¹⁰². Entsprechend den Makrophagen des Immunsystems sind angeregte Mikroglia in der Lage, Infektionserreger, beschädigte und tote Zelle sowie zellulären Abfall zu phagozytieren ¹⁰⁵. Weiterhin können aktivierte Mikroglia proinflammatorische Mediatoren, wie Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. reactive oxygen species), Komplementfaktoren, freie Radikale oder Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen, die eine Entzündungsreaktion auslösen ¹⁰⁶. Zusätzlich besitzen aktivierte Mikroglia, durch die Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (MHC, engl. major histocompatibility complex) eine weitere Funktion als antigenpräsentierende Zelle, die zur Aktivierung von T-Lymphozyten führen kann ¹⁰⁷. Zu den mikroglialen Funktionen im aktivierten Zustand gehören außerdem die Produktion sowie Freisetzung von neurotrophischen und anti-inflammatorischen Faktoren, die der Unterstützung von gefährdenden Neuronen dienen ^{108,109}.

Nach erfolgreicher Bekämpfung der akuten Gewebeschädigung und Herstellung der normalen Homöostase im ZNS reduziert sich die Anzahl der aktivierten Mikroglia durch Apoptose bzw. durch Einwanderung in das Blutsystem. Die übriggebliebenen Mikroglia kehren in ihre ruhende Form zurück und übernehmen wiederum die Aufgabe der Homöostaseüberwachung ⁹⁰. Bei chronischen Erkrankungen des ZNS, wie z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen, sind die Mikroglia jedoch dauerhaft aktiviert. Zunehmende Befunde deuten darauf hin, dass diese kontinuierliche Stimulation der Mikroglia zu den auftretenden neuro-inflammatorischen Prozessen im Verlauf dieser Erkrankungen beitragen ¹¹⁰. Dennoch ist die genaue Rolle der Mikroglia im Krankheitsverlauf von

neurodegenerativen Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz (AD) und der Parkinson Erkrankung (PD, engl. Parkinson's disease) unklar und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.2.3 Aktivierung von Mikroglia

Das ZNS ist ein spezialisiertes Gewebe und gehört zu den immunprivilegierten Organen, das sich gegen potentiell schädliche Folgen einer Immunreaktion selbst schützt¹¹¹. Aus diesem Grund ist die Aktivierung von Mikroglia, als Immunzellen des ZNS, ein hoch gesteuerter Prozess¹⁰². Viele Moleküle und veränderte Bedingungen können die Transformation von ruhenden zu aktivierten Mikroglia auslösen. Diese haben alle gemeinsam, dass sie eine Bedrohung für die strukturelle und funktionelle Integrität des ZNS darstellen.

Mikroglia sind in der Lage, eine breite Palette von Zeichen für die Störung der Gewebshomöotase, unabhängig von ihrer biochemischen Natur (Peptide, Lipoproteine, Glykolipide, Nukleotide) oder ihren pathophysiologischen Auswirkungen, zu erkennen. Dabei beruht die mikrogliale Reaktionsfähigkeit auf zwei unterschiedlichen Aktivierungsprinzipien. Zum einem kann die Aktivierung von ruhenden Mikroglia durch die Bindung eines spezifischen Liganden an die zahlreich auf ihrer Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren erfolgen⁹⁰. Auf diesem Wege registrieren Mikroglia plötzlich auftretende Faktoren, die in der Regel nicht im ZNS vorhanden sind (z.B. mikrobielle Strukturen) oder Substanzen, die in kritischen Konzentrationen vorkommen (z.B. intrazelluläre Bestandteile) und werden daraufhin aktiviert. Ebenso löst das Auftreten von Stoffen in abnormaler Form (z.B. Proteinaggregate) eine Aktivierung der Mikroglia aus¹¹²⁻¹¹⁴. Auf der anderen Seite werden ruhende Mikroglia aber auch durch Zerstörung von konstitutiven Ligand-Rezeptor-Verbindungen, wie z.B. des CD200-CD200R oder des CX3CL1-CX3CR1, die aufgrund des engen Kontaktes von einigen ihrer Zellausläufern mit benachbarten Neuronen und Astrozyten bestehen, in einen aktivierten Zustand versetzt^{115,116}. Diesen durch Beeinträchtigung der neuronalen oder astrozytären Integrität ausgelösten Aktivierungsmechanismus durchlaufen Mikroglia in Unabhängigkeit von der Art des pathologischen Einflusses⁹⁰. Auf Grundlage dieser beiden unterschiedlichen Prinzipien der Aktivierung sind Mikroglia fähig, auf bekannte und unbekannte Faktoren der Homöostase-Störung zu reagieren.

Die beschreibenden Aktivierungsprozesse resultieren aber nicht in einer vordefinierten mikroglialen Reaktion, sondern sind, in Abhängigkeit der pathologischen Auswirkung, zeitliche und räumlich gut abgestimmte Ausbildungen von unterschiedlichen funktionellen Phänotypen der Mikroglia⁹⁰. Die mikrogliale Aktivierung ist daher eher als eine Veränderung des Funktionspektrums als eine Aktivierung nach dem „Alles oder nichts“-Prinzip anzusehen. Beim plötzlichen Auftreten von Aktivierungssignalen oder dem Verlust von konstitutiven Ligand-Rezeptoren-Verbindungen werden die ruhenden Mikroglia in einen alarmierten

Zustand versetzt, in welchem sie die Signale auf ihren pathologischen Kontext hin interpretieren und in eine initiale Reaktion ihrerseits umwandeln. Im Falle von winzigen vaskulären oder neuronalen Beschädigungen produzieren Mikroglia hauptsächlich neurotrophische Substanzen zum Schutz des gefährdenden Areals. Über solche lokal begrenzten und vorübergehenden Tätigkeiten von Mikroglia, die zahlreich im gesunden ZNS vorkommen und zur allgemeinen mikroglialen Funktion gehören, ist jedoch bis heute wenig bekannt ¹⁰². Stärkere Beeinträchtigungen der ZNS-Homöostase, wie z.B. bei Infektionen oder größeren Verletzungen, lösen dagegen weitaus dramatischere Veränderungen im funktionellen Phänotyp der Mikroglia aus. Je nach Art der pathologischen Situation entstehen verschiedene reaktive Phänotypen von Mikroglia, die sich sowohl auf Transkriptionsebene als auch in der Sekretion von Substanzen (z.B. Zytokinen, Chemokinen, ROS) und in ihrer Phagozytoseaktivität unterscheiden können ⁹⁰. Im Verlauf einer mikroglialen Antwort kann sich jedoch jederzeit der funktionelle Phänotyp von Mikroglia ändern. Dieser Wechsel in den Aktivitäten wird durch die Beseitigung der pathologischen Bedingung hervorgerufen oder durch Signale vom benachbarten Neuronen und Astrozyten sowie in das ZNS eingewanderten Immunzellen gesteuert. Dadurch können Mikroglia, die in ihrer ersten Reaktion der Verteidigung des Gewebes, z.B. durch Freisetzung von pro-inflammatorischen Stoffe dienen, in Mikroglia mit neuroprotektiven Eigenschaften umgewandelt werden (Abb.: 3) ⁹⁰. Bei chronischen pathologischen Szenarien, wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen oder Tumoren, sind Mikroglia über einen anhaltenden Zeitraum höchst reaktiv, das heißt sie sezernieren Substanzen, die eine Entzündungsreaktion bis hin zur Aktivierung von Lymphozyten auslösen ¹⁰⁷. Allerdings deuten genügend Beweise daraufhin, dass diese vollständig aktivierten Mikroglia aufgrund der Freisetzung von reaktiven Spezies wie ROS, Stickstoffmonoxid (NO) und dem Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) eine neurotoxische Wirkung auf das umliegende Gewebe haben könnten ^{114,117}. Wie genau dieser funktionelle Phänotyp der aktivierten Mikroglia mit Gewebeschädigung und Funktionsbeeinträchtigung des ZNS korreliert, ist jedoch ungeklärt.

Obwohl noch eine Vielzahl an Forschung über die mikrogliale Aktivierung und dessen Folgen erforderlich ist, weiß man noch weniger über die Mikroglia in der unmittelbaren Zeit nach erfolgreicher Wiederherstellung der normalen Homöostase. Während einige aktivierte Mikroglia absterben oder in das Blutsystem auswandern, gelangen andere in die charakteristische Form von ruhenden Mikroglia zurück. Dabei wird vermutet, dass ein Teil dieser Mikroglia nicht komplett in den naiven Zustand zurückkehrt und feine Veränderungen in der Transkriptionsaktivität beibehalten. Sie werden als postaktivierte Mikroglia bezeichnet, die eine höhere Sensitivität gegenüber Aktivierungssignalen haben und eine geänderte Funktionalität auf eine nachfolgende Stimulation zeigen (Abb.: 3) ⁹⁰.

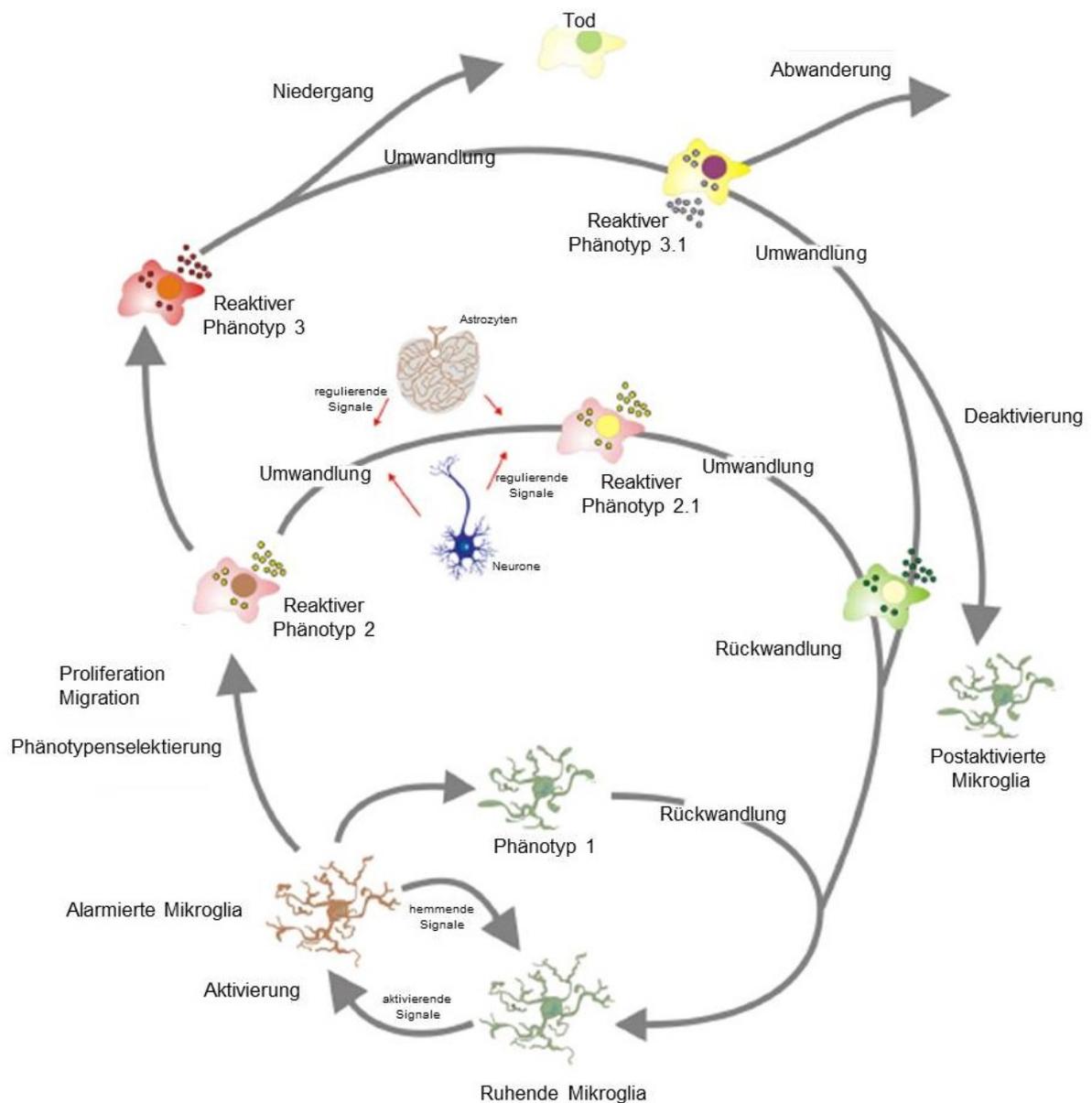


Abb. 3: Mikrogliale Aktivitätsstadien während der Aktivierung. Die ruhende Mikroglia überprüft konstant ihre Umgebung auf exogene und endogene Signale, die eine Bedrohung für die Gewebs-homoöstase darstellen könnten. Das plötzliche Auftreten von aktivierenden Signalen oder der Verlust von konstitutiv hemmenden Verbindungen resultiert in einer Aktivierung der ruhenden Mikroglia. In Abhängigkeit vom pathologischen Reiz kann es zur Ausbildung verschiedener mikroglialer reaktiver Phänotypen kommen. Zusätzliche Signale von z.B. Astrozyten oder Nervenzellen können jedoch eine Umwandlung des reaktiven mikroglialen Phänotypes bewirken. Nach erfolgreicher Bekämpfung der pathologischen Bedingung können Mikroglia in den naiven Ruhezustand zurückkehren. Ein Teil der Mikroglia bleibt jedoch postaktiviert. Diese Mikroglia sind dadurch gekennzeichnet, dass sie bei wiederkehrenden pathologischen Stimulis eine veränderte Reaktionsfähigkeit zeigen (entnommen aus¹⁰²).

1.2.4 Phagozytose von Mikroglia

Mikroglia, als residente Gewebemakrophagen des ZNS, sind Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose. Sie werden daher auch als Fresszellen des Gehirns bezeichnet. Die phagozytierende Funktion der Mikroglia spielt sowohl während der Entwicklung als auch bei krankhaften Ereignissen im ZNS eine wichtige Rolle. Im Verlauf der embryonalen und frühen postnatalen Phase, im Zuge der normalen Entwicklung des Gehirns, entfernen Mikroglia eine große Anzahl von auftretenden apoptotischen Neuronen und sind in der Eliminierung von ungewollt ausgebildeten Synapsen involviert ^{118,119}. Unter pathologischen Bedingungen, in ihrem aktivierten Zustand, sind Mikroglia in der Lage, Krankheitserreger, apoptotische Zellen sowie zellulären Abfall zu umschließen und zu phagozytieren ¹⁰⁵. Aus diesem Grund stellt die Phagozytosefähigkeit von Mikroglia eine ihrer wichtigsten Funktionen dar, um das ZNS vor eindringenden Pathogenen und Gewebsverletzung zu schützen.

Die mikrogliale Phagozytose ist ein streng koordinierter Prozess, der hauptsächlich durch Signale gesteuert wird, die Mikroglia aus ihrer Umgebung erhalten. Mikroglia exprimieren auf ihrer Zelloberfläche verschiedene Arten von Rezeptoren, die entweder an der Phagozytose von pathogenen Organismen oder an der Beseitigung von apoptotischen Zellen bzw. Zelltrümmern beteiligt sind. Durch Aktivierung der Rezeptoren wird den Mikroglia signalisiert, ihre phagozytische Tätigkeit aufzunehmen. Die meisten mikrobiellen Krankheitserreger werden von Mikroglia über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs, engl. toll-like receptors), Komplementrezeptoren (CRs, engl. complement receptors), Fc-Rezeptoren (FcRS) und Fresszellen-Rezeptoren (SRs, engl. scavenger receptors) erkannt ¹²⁰. Dabei ist die mikrogliale Phagozytose von pathogenen Mikroorganismen immer mit der Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ und Stickstoffmonoxid-Synthase-2 (NOS-2, engl. nitric oxide synthase-2) verbunden ^{121,122}, was die Rekrutierung von peripheren Immunzellen und weiteren reaktiven Mikroglia auslöst ¹²³. Im Gegensatz dazu sezernieren Mikroglia bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen und zellulären Trümmern, wie z.B. Myelinabfall, anti-inflammatorische Substanzen (Abb.: 4) ¹²⁴. Die Beseitigung von absterbenden Zellen bzw. Zellresten erfolgt dabei mit Hilfe von Phosphatidylserin- (PtdSer) erkennenden Rezeptoren wie dem T-Zell-Immunglobulin Mucin 4 (TIM-4). In der gesunden Zelle ist PtdSer im Inneren der Plasmamembran lokalisiert. Beim Absterben der Zelle kommt es zur Umlagerung des PtdSer auf die Außenseite der Plasmamembran, das von den mikroglialen TIM-4-Rezeptoren erkannt wird und den Phagozytosevorgang auslöst ¹²⁵. Ein anderer Rezeptor, der auch an der Phagozytose in Verbindung mit der Freisetzung von anti-inflammatorischen Stoffen verbunden ist, ist der purinerge Rezeptor P2Y6 ¹²⁶. Daher scheint ATP und deren Analoge, abgegeben durch beschädigte Neuronen oder Astrozyten, ein

wichtiger Faktor in der Auslösung und Modulation der mikroglialen Phagozytose zu sein ¹²⁶⁻

128

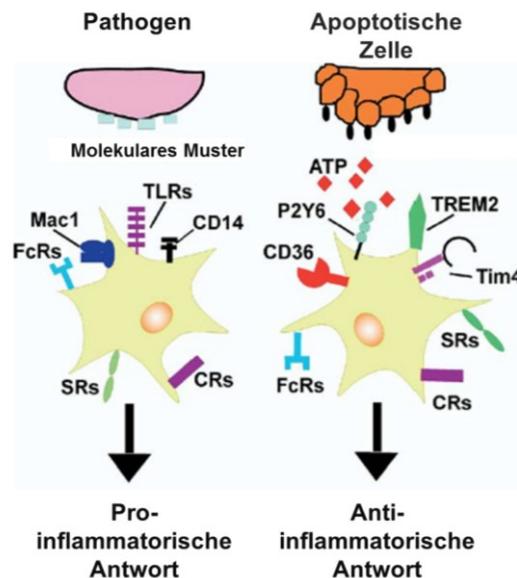


Abb. 4: Mikrogliale Phagozytose. Mikroglia exprimieren unterschiedliche Klassen von phagozytischen Rezeptoren, die entweder eine pro- oder anti-inflammatorische Antwort vermitteln. Mikroglia erkennen spezifische strukturelle Muster der meisten mikrobiellen Pathogene über ihre Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs), Komplementrezeptoren (CRs), Fc-Rezeptoren (FcRS) oder Fresszellen-Rezeptoren (SRs), deren Stimulierung zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Dagegen erkennen Mikroglia apoptische Zellen an den PtdSer auf deren Oberfläche über ihre TIM-4-Rezeptoren und phagozytieren diese Zellen mit Unterstützung von zusätzlichen Rezeptoren (P2Y6 and TREM2.). Die Phagozytose von apoptotischen Zellen induziert eine Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen. (entnommen aus ¹²⁰)

Zusätzlich konnte durch viele Studien gezeigt werden, dass es mehrere Faktoren gibt, die die mikrogliale Phagozytoseaktivität beeinflussen können. So führt beispielsweise die Inhibition von Chloridkanälen in den Mikroglia zur Verminderung ihrer phagozytischen Leistung. Dies lässt vermuten, dass der intrazelluläre Chloridspiegel eine wichtige Rolle in mikroglialen Phagozytoseaktivität spielt ¹²⁹. In Zellkulturexperimenten konnte außerdem nachgewiesen werden, dass sowohl der von Gliazellen stammende neurotrophe Faktor (GDNF, engl. glial cell line-derived neurotrophic factor) als auch der M-CSF imstande sind, die Phagozytosekapazität von Mikroglia hoch zu regulieren ^{130,131}. Des Weiteren ist beschreiben, dass die Opsonierung der zu entfernenden Substrate mit dem Komplementfaktor C1q die mikrogliale Phagozytose um das zwei- bis vierfache steigert ¹³².

Neben der Rezeptor-vermittelten Phagozytose sind Mikroglia auch in der Lage, eine andere Form der Endozytose durchzuführen. Mit diesem als Makropinozytose bezeichneten Prozess

können Mikroglia Flüssigkeitstropfen mit darin gelösten Substanzen, wie z.B. Proteinen, aus dem extrazellulären Raum in ihr Zellinnere aufnehmen ¹²⁰.

Da Mikroglia bei akuten und chronischen Erkrankungen die erste Verteidigungslinie des ZNS darstellen und eine ihrer wichtigsten Funktionen in der Beseitigung von Pathogenen sowie apoptotischen Zellen besteht, ist die Identifikation von möglichen Faktoren, die die mikrogliale Phagozytoseaktivität regulieren, von großer Bedeutung. Die Erforschung dieser könnte neue Perspektiven für Therapieansätze zur Behandlung von akuten ZNS-Läsionen sowie neurodegenerativen Krankheiten öffnen.

1.3 Mikroglia und Alzheimer-Demenz

Von einer Beteiligung der Mikroglia im Verlauf der AD wird allgemein ausgegangen. Diese Ansicht resultiert aus zahlreichen Untersuchungen, die das Vorhandensein von aktivierten Mikroglia in der näheren Umgebung der amyloiden Plaques in AD-Patienten als auch in transgenen Tiermodellen demonstrierten ^{39,133}. Für eine mikrogliale Involvierung im Krankheitsverlauf sprechen außerdem *in vitro* Studien, die gezeigt haben, dass A β -Peptide, die Hauptbestandteile der amyloiden Plaques, in der Lage sind, Mikroglia zu aktivieren ^{117,134}. Jedoch bleibt die präzise Rolle der Mikroglia während der AD-Pathogenese, trotz intensiver Forschung, bis heute ungeklärt. Hypothesen mit Hinblick auf eine potenzielle neuroprotektive Rolle der Mikroglia in Verbindung mit der Plaquebeseitigung bzw. im Plaqueabbau sind mögliche schädliche inflammatorische Effekte hervorgerufen durch Mikroglia gegenübergestellt ^{39,135}.

In vivo-Studien mit Hilfe der 2-Photonen-Mikroskopie an transgenen Mausmodellen der zerebralen β -Amyloidosis belegen, dass neugebildete A β -Plaques innerhalb von ein bis zwei Tagen von aktivierten Mikroglia umgeben sind ¹³⁶. Es wird vermutet, dass diese schnelle Reaktion residenter Mikroglia zwar nicht zur Beseitigung der neu entstandenen amyloiden Ablagerungen führt, jedoch eine Rolle in der anfangs beobachteten gleichbleibenden Größe der Plaques nach ihrer Bildung spielt ¹³⁷. Mit Voranschreiten der Krankheit erhöht sich die Anzahl der Plaque-assoziierten Mikroglia in einer konstanten Art und Weise (2-3 Mikroglia pro Plaque pro Monat in Mäusen) bis zu einem Maximum in Bezug auf die jeweilige Plaquegröße ¹³⁸. Dabei konnte durch eine Langzeitstudie gezeigt werden, dass sich, neben der Mehrzahl der Plaques mit einer relativ konstant bleibenden Größe, die Größe von einigen Plaques in Abhängigkeit zum Volumen der assoziierten Mikroglia über die Zeit ändert. Wachsende Plaques wiesen eine geringe mikrogliale Bedeckung auf, wohingegen kleiner werdende Plaques mit einem großen Volumen von aktivierten Mikroglia umgeben waren ¹³⁸. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Mikroglia das Wachstum der A β -Plaques einschränken und sogar teilweise zur Reduktion der Plaquegröße fähig sind. Das

Mikroglia dazu in der Lage sind, A β zu phagozytieren, wurde in zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen¹³⁹⁻¹⁴¹. Neben der Makropinozytose, mit der Mikroglia lösliches A β aus ihrer Umgebung entfernen¹⁴², bilden Mikroglia Rezeptoren wie z.B. CD36, CD47 und den alpha6beta1-Integrinrezeptor aus, die sie zur Phagozytose von fibrillären A β befähigt¹⁴³. Ein weiterer Hinweis, der die neuroprotektive Funktion der Mikroglia hinsichtlich der Einschränkung des Plaquewachstums und der Beseitigung der A β -Anreicherung unterstützt, ist die Tatsache, dass Mikroglia A β -abbauenden Enzyme, wie Nephilysin (NEP) und dem Insulin-degradierende Enzym (IDE) exprimieren sowie freisetzen können^{135,144}. Im Gegensatz dazu zeigte jedoch eine zwei- bzw. vierwöchige Ablation von residenten Mikroglia in einem transgenen AD-Mausmodell keinen offensichtlichen Effekt sowohl auf die Plauegröße als auch auf die Konzentrationen von A β_{40-42} im murinen Gehirn¹⁴⁵. Studien an knochenmarkchimären AD-Mäusen demonstrierten allerdings eine massive Infiltration von Blutmonozyten in das Hirngewebe und belegten, dass die meisten Plaue-assoziierten Mikroglia von den neu eingewanderten Monozyten des blutbildenden Systems abgeleitet waren¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Die Erkenntnisse im Zusammenhang mit der fehlenden Auswirkung bei der Ablation der intrinsischen Mikroglia auf die Plaueformation lassen darauf schließen, dass die von Knochenmark abgleitenden neu rekrutierten mikroglialen Zellen und nicht die im neuronalen Gewebe residenten Mikroglia für die Inhibition des Plauewachstums bzw. der teilweisen Reduzierung der Plauegröße verantwortlich sind^{148,149}. Diese Hypothese wird unterstützt durch Untersuchungen, die eine unterschiedliche Phagozytosefähigkeit von Mikroglia und Makrophagen für A β -Peptide darlegen. Das mikrogliale Lysosomen ist weniger sauer als das von Makrophagenzelllinien, wodurch der Abbau von fibrillären A β nachweislich beeinträchtigt wird¹⁵⁰. Dies könnte zur Folge haben, dass die residenten Mikroglia weniger A β aufnehmen, im Gegensatz zu den neu, aus eingewanderten Blutmonozyten, differenzierten Mikroglia, die in ihrer Entwicklung den Makrophagen des angeborenen Immunsystems noch sehr nahestehen. Neben der potenziellen Bedeutung der Mikroglia hinsichtlich der Begrenzung des Plauewachstums und im Plaueabbau ist die nachgewiesene mikrogliale Sezernierung von neurotrophen Faktoren, wie z. B. GDNF, ein zusätzlicher Hinweis für eine neuroprotektive Rolle der Mikroglia während der AD-Pathogenese¹⁵¹.

Andererseits stehen Mikroglia in Verdacht, durch die von ihnen induzierten inflammatorischen Effekte, für die neuronalen Schäden im Krankheitsverlauf der AD verantwortlich zu sein. Diese potenziell neurotoxische Rolle wird durch Zellkulturexperimente gestützt, die zeigten, dass Mikroglia auf die Stimulation mit A β -Peptiden mit der Produktion von großen Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , TNF- α sowie IL-6, reagieren^{117,134}. Die Überproduktion dieser Zytokine ist in der Lage, eine Entzündungsreaktion mit nachweislich schädlichem Einfluss auf Nervenzellen auszulösen¹³⁴. Aufgrund der dauerhaften Aktivierung

der Mikroglia durch die konstitutive Assoziation mit den amyloiden Ablagerungen kommt es demnach im Verlauf der AD zur einer chronischen Entzündungsreaktion im Hirngewebe, welche zu dem charakteristischen massiven Neuronensterben beitragen kann. Die gezeigte Verbesserung kognitiver Funktionen in Folge einer Unterdrückung der mikroglialen Entzündungsreaktion durch Behandlung von AD-transgenen Mausmodellen mit nicht steroidalen anti-inflammatorischen Medikamenten (NSAIDs, engl. nonsteroidal anti-inflammatory drugs) ist ein zusätzlicher Hinweis auf eine mögliche Induzierung von neurotoxischen Effekten durch die mikrogliale Aktivierung während der AD-Pathogenese¹⁵². Angesichts der Erkenntnis, dass Mikroglia in Gegenwart von fibrillären A β eine gesteigerte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zeigen und der Tatsache das in Gehirnen von AD-Patienten und von transgenen Tiermodellen vermehrt oxidative Schädigungen an neuronalen Peptiden, Nukleinsäuren sowie Proteinen auftreten, wird die mikrogliale Aktivierung auch in Verbindung mit einem erhöhten oxidativen Stress während der AD-Progression gebracht^{29,153,154}. Die Aktivierung der Mikroglia durch amyloide Ablagerungen kann außerdem in eine zunehmende Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) resultieren⁹⁰. Das von der iNOS produzierte Stickstoffmonoxid (NO) wirkt in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf das Nervengewebe¹⁵⁵. So konnte in einer Studie an iNOS-defizienten AD-Mäusen gezeigt werden, dass die Ablation der iNOS die Tiere vor frühzeitigem Tod aufgrund neuronaler Schäden schützt¹⁵⁶. Dieses Ergebnis deutet wiederum auf einen schädlichen Einfluss der Mikroglia im Verlauf der AD-Erkrankung hin.

In Anbetracht der dargelegten unterschiedlichen Auswirkungen der mikroglialen Reaktion auf die A β -Plaques spricht vieles für eine duale Rolle der Mikroglia während der AD-Pathogenese mit nützlichen und schädlichen Funktionen. Mittlerweile existiert allerdings die Hypothese, dass Mikroglia ihren funktionellen Phänotypen im Verlauf der AD-Erkrankung wechseln^{157,158}. Demzufolge ist die, durch die Bildung der A β -Plaques ausgelöste, initiale Mikrogliaaktivierung neuroprotektiv. Zu diesem frühen Zeitpunkt ihrer Aktivierung sind Mikroglia in der Lage, A β zu phagozytieren und verzögern somit die Progression der AD-Pathologie. Im weiteren Krankheitsverlauf jedoch verlieren Mikroglia aufgrund der anhaltenden Stimulierung durch die amyloiden Ablagerungen ihre Fähigkeit zur A β -Eliminierung¹⁵⁸. Infolge dessen produzieren Mikroglia dauerhaft pro-inflammatorischen Zytokine, ROS und iNOS¹⁵⁹. Diese Produkte der aktivierten Mikroglia fördern dann, zusammen mit dem verringerten A β -Abbau, die neuronale Degeneration.

Obwohl über die genaue Rolle der Mikroglia während der AD-Pathogenese noch unterschiedliche Ansichten bestehen, gibt es genügend Beweise, dass die Modulation der mikroglialen Reaktion hinsichtlich ihrer Migration, Proliferation sowie Expression von bestimmten Molekülen zur Förderung oder Reduzierung der A β -Pathologie in transgenen AD-Tiermodellen führt^{156,160–162}. Daher ist es von großer Bedeutung, die mikrogliale Aktivierung in Mausmodellen der zerebralen β -Amyloidosis zu untersuchen um Faktoren zu

identifizieren, die die Funktion der Mikroglia während der AD-Pathogenese beeinflussen. Mit dem Wissen spezieller Regulationsmechanismen kann eine gezielte Mikrogliaaktivierung erfolgen, die Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungen für AD-Patienten darstellen könnten.

2. Zielstellung

Mikroglia sind die residenten Immunzellen des zentralen Nervensystems. Die seit längerer Zeit bekannte Assoziation von reaktiven Mikroglia um die amyloiden Ablagerungen deutet auf eine mikrogliale Beteiligung im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung hin. Trotz intensiver Forschung ist jedoch die genaue Funktion der Mikroglia während der AD-Pathogenese bis heute umstritten. Auf der einen Seite wird den Mikroglia eine neuroprotektive Rolle hinsichtlich Plaquebeseitigung/abbau zugesprochen. Demgegenüber steht allerdings die Ansicht, dass Mikroglia eine krankheitsfördernde Wirksamkeit besitzen, indem sie - aufgrund der chronischen Aktivierung durch A β - neurotoxische Stoffe freisetzen. Die beiden Theorien bilden jedoch die Basis für ein von vielen Wissenschaftlern mittlerweile favorisiertes Konzept, dass Mikroglia verschiedene Funktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der AD-Pathogenese besitzen.

Um diese Hypothese zu untersuchen, ist das erste Ziel der Arbeit die qualitative sowie quantitative Analyse der temporären und spatialen mikroglialen Aktivierung um und in den amyloiden Plaques im APP/PS1-Mausmodell der AD. Zusätzlich sollen sowohl der Einfluss der genetischen Konstitution als auch der mitochondrialen Funktion auf die mikrogliale Aktivierung im Hinblick auf die A β -Pathologie im APP/PS1-Mausmodell untersucht werden, um potenziell regulierende Faktoren der mikroglialen Reaktivität während AD-Progression zu identifizieren. Ein weiterer Bestandteil der Arbeit ist die Generierung von APP/PS1 knochenmarkschimären Mäusen, die Mikroglia-spezifische mitochondriale Veränderungen besitzen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen mitochondrialen Polymorphismen und Mikrogliafunktion während der AD-Pathogenese zu analysieren.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
Agarose	Biozym Diagnostik GmbH
Ameisensäure	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Bovines Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
EDTA	MERCK KgaA
Essigsäure	J. T. Baker
Ethanol	Zentralapotheke
Ethidiumbromid	MERCK KgaA
Fetales Kälberserum	Lonza
FITC markiertes A β 42	rPeptide, USA
Gefriermedium (Kryoblock)	Medite
Glycerol	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth GmbH
Hämatoxilin	Medite
Igepal 630	Sigma-Aldrich Co.
Isopentan (2-Methyl-Butan)	Carl Roth GmbH
Isopropanol	Sigma-Aldrich Co.
Kaliumacetat	MERCK KgaA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Methanol	Zentralapotheke
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Natriumazid	Carl Roth GmbH
Natriumcarbonat	Zentralapotheke
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH

Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH
Normales Ziegenserum	Vector Laboratories
Paraffin (Histowax)	Leica / Menarini
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich Co.
Pertex	Medite
Protease Inhibitor Mix	Roche
Saccharose	Carl Roth GmbH
Salzsäure	Carl Roth GmbH
Trichloressigsäure	Ferak Laborat GmbH
Tris	Carl Roth GmbH
Tris-HCl	Carl Roth GmbH
Tween 20	MERCK KgaA
Xylencyanol	Carl Roth GmbH
Xylol	Carl Roth GmbH

3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Agarosegelkammern	Eigenbau
Analysenwaage	Sartorius
Autoklav	Zirbus Technology
BioVortex	Lab4You GmbH
DeVision Dbox	Decon DC ScienceTec,
Einbettautomat EG1160	Leica
Eindeckautomat CV5030	Leica
Entwässerungsautomat TP1020	Leica
Färbeautomat BondMax	Leica / Menarini
Fluoreszenz- Mikroskop Imager 1	Zeiss MicroImaging GmbH
Gefriermikrotom CM3050S	Leica
Gefrierschränke (-20°C, -80°C)	National Lab
Homogenisator Precellys	Peqlab
IBL 637 (Kleintier Gammabestrahlungsapparat)	CIS-BioInternational
Inkubator 1000	Heidolph
Kassettdrucker IPC	Leica
Kühlplatte EG1150C	Leica
Kühlschränke (4°C)	Gorenje
Laser Scanning Mikroskop (LSM700)	Zeiss Microsystems GmbH
Magnetrührer MSH 300	Lab4You GmbH

Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss MicroImaging GmbH
Mikrotome RM2265, RM2155	Leica
Mikrowelle	Serin
Mini-Protean	BioRad Laboratories
Mirax Slide Scanner	Zeiss MicroImaging GmbH
Nanodrop 1000	Thermo Fischer Scientific
Objektträgerdrucker IPS	Leica
Orbitalschüttler Os-20	Lab4You GmbH
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo
PARADIGM	Beckman Coulter
Präparierbesteck	Fine Science Tools
Precellys 24 Homogenisator	Precellys
PAGE-Gelelektrophorese-Kammer	BioRad Laboratories
Streckbäder HI1210	Leica
Tank-Blot	Biozym Diagnostik GmbH
Tecan Sunrise	Tecan GmbH
Thermocycler TGradient	Biometra
Thermoschüttler TS-100	Lab4You GmbH
Trockenschrank	Binder
Waage EMB 500-1	Kern&Sohn GmbH
Whatman Papier	Carl Roth GmbH
Zentrifuge Z100M	Hermle
Zentrifuge Z323K	Hermle

3.1.3 Enzyme

Proteinase K	Qiagen GmbH
RNase A	Promega
Dnase	Promega
Trypsin/ EDTA	Carl Roth GmbH

3.1.4 Kits und Fertiglösungen

100bp BLUE eXtended DNA Ladder	BIORON GmbH
1kb Blue DNA Ladder	BIORON GmbH
ATP Bioluminescent Assay Kit	Sigma Aldrich Co.
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Bond™ Polymer AP-Red Detection DS9800	Leica / Menarini
Bond™ Polymer Refine Detection DS9800	Leica / Menarini

hAmyloid β 42 Elisa (high sense)	The Genetics Company (TGC)
Hot start Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen GmbH
Protease Inhibitor „Complete Mini“	Roche Diagnostics GmbH
RNA Stabilization Solution	Qiagen GmbH
RNA later	Applied Biosystems
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen GmbH
VECTASHIELD	Vector Laboratories

3.1.5 Antikörper

3.1.5.1 primäre Antikörper

Anti-human A β (clone 6F3D)	DAKO GmbH
Anti-human A β (clone 6E10)	Covance Company
Anti-Maus IBA1	Wako Chemicals GmbH

3.1.5.2 sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen IgG, TRITC gekoppelt	Acris Antibodies GmbH
anti-Maus IgG, TRITC gekoppelt	Acris Antibodies GmbH
Cy3 Ziege Anti-Kaninchen IgG	Acris Antibodies GmbH
Cy3 Ziege Anti-Maus IgG	Acris Antibodies GmbH

3.1.6 Primer (Oligonukleotide)

APPswe-forward	5` GAATTCGACATGACTCAGG 3`
APPswe-reverse	5` GTTCTGCTGCATCTTGGA CA 3`

3.1.7 Puffer und Lösungen

3.1.7.1 Puffer und Lösungen für Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz

Saccharoselösung

15%

15 % (w/v) Saccharose

0,1% (w/v) NaN₃ in PBS

pH = 7,0 einstellen

25%

25 % (w/v) Saccharose

0,1% (w/v) NaN₃ in PBS

pH = 7,0 einstellen

1x PBS	137 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2,6 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml ddH ₂ O pH = 7,4 einstellen, autoklavieren
Normales Ziegenserum	5 % (v/v) normales Hühnerserum 0,3% (v/v) Triton X-100 in PBS
Antikörper - Verdünnungslösung	0,3 % (v/v) Triton X-100 in PBS
1x TBS	100 mM Tris-HCl, pH = 7,4 150 mM NaCl pH = 7,4 einstellen

3.1.7.2 Puffer und Lösungen für molekularbiologische - sowie Zellkulturarbeiten

Ethidiumbromid-Lösung	1 mg/ml ddH ₂ O
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH = 8,0 einstellen mit CH ₃ COOH
10x DNA-Ladepuffer	60 mM EDTA 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 0,03 % (v/v) Bromphenolblau 0,03 % (v/v) Xylencyanol 60,0 % (v/v) Glycerol
Mausschwanz-Lysepuffer	10 mM Tris-HCl, pH = 9,0 1 M KCl 0,4 % (v/v) Igepal 630 0,1 % (v/v) Tween 20

Ampicillin	100 mg/ml
Proteinlyse-Puffer 1	150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM PMSF 0,5 % (w/v) SDS 0,1 % (v/v) Igepal 630 100 mM Tris-HCl, pH = 7,6 vor Gebrauch 7x Protease Inhibitor zusetzen
Proteinlyse-Puffer 2	150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH = 7,6 0,1 % (v/v) Triton X-100
1M Carbonat-Puffer	1,05 g Na ₂ CO ₃ 0,29 g NaCl ad 100 ml ddH ₂ O (kurz vor Gebrauch Zugabe des Protease Inhibitors)
5M Guanidin-Puffer	95,53 g CH ₅ N ₃ HCl 50 mM Tris-HCl, pH = 8,0 ad 200 ml ddH ₂ O
8M Guanidin-Puffer	156,67 g CH ₅ N ₃ HCl 82 mM Tris-HCl, pH = 8,0 ad 200 ml ddH ₂ O
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	10,0 % (v/v) FBS 1,0 % (v/v) Glut/Max 1,0 % (w/v) Penicillin/ Streptomycin

3.1.8 Mausmodelle

1. C57BL/6 (B6): Harlan Laboratories

Der C57BL/6, auch bezeichnet als "Black6" Mauslinie, ist einer der bekanntesten Inzuchtstämme von Labormäusen. Die meisten Mausmodelle für humane Erkrankungen

besitzen den genetischen Hintergrund dieses Mausstammes. Neben der Verwendung in der Aufrechterhaltung der Zucht des APP/PS1-B6 Mausstammes wurde diese Mauslinie bei der Generierung der mitochondrial konplastischen APP/PS1-B6xmtNOD Mauslinie verwendet.

2. APP/PS1-B6 : Radde et.al.¹⁶³

Hierbei handelt es sich um einen Mausstamm im C57BL/6 (B6) genetischen Hintergrund mit zwei humanen Transgenen. Das erste Transgen ist ein mutiertes Präsenilin 1, dessen Mutation die am häufigsten identifizierte Mutationen bei der familiären Form der AD darstellt¹⁶⁴. Zusätzlich exprimiert dieses Mausmodell ein humanes APP-Transgen mit einer Doppelmutation (Lys⁶⁷⁰Asn, Met⁶⁷¹Leu), die als schwedische Form (APP^{swe}) bezeichnet wird. Sowohl das PS1- als auch das APP^{swe}-Transgen stehen unter der Kontrolle des Thy1-Promotors, der eine postnatale und neuronspezifische Expression gewährleistet. Die Überexpression beider Transgene in den Mäusen führt zu ersten Plaqueablagerungen im Neokortex innerhalb von 45 Tagen postnatal. Neben der Funktion als Kontrollstamm wurde diese Mauslinie bei der Generierung des APP/PS1-FVB - und des APP/PS1-B6xmtNOD Mausstammes verwendet. Außerdem wurde aus APP/PS1-B6 Tieren AD-Knochenmark-chimäre Mäuse durch Transplantation von Knochenmarkszellen der Cx3CR1/eGFP-B6 sowie Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD Mauslinie generiert.

3. APP/PS1-FVB:

Dieses AD-Mausmodell wurde durch die Rückkreuzung von APP/PS1-B6 Tieren über mindestens zehn Generationen mit Tieren des FVB/N-Inzuchtstammes (Taconic) generiert. APP/PS1-FVB Tiere besitzen dadurch die gleichen Transgene wie die APP/PS1-B6 Mäuse, befinden sich jedoch im genetischen Hintergrund des FVB/N Stammes. Sie wurden für die Untersuchungen des Einflusses des nukleären genetischen Hintergrundes auf die mikrogliale Aktivierung im Verlauf der AD-Erkrankung verwendet.

4. APP/PS1-B6xmtNOD:

Hierbei handelt es sich um einen Mausstamm, der durch die Verpaarung von Tieren der Mausinzuchtstämme C57BL/6 (B6) und NOD/LtJ (JAX Laboratories) erzeugt wurde. Der durch die Einkreuzung von weiblichen Tieren des NOD/LtJ mit C57BL/6 (B6) Tieren über mehrere Generationen (>9) generierte, B6xmtNOD Mausstamm besitzt ausschließlich die Mitochondrien der NOD/LtJ Mauslinie im genetischen Hintergrund des B6 Mausstammes. Die mitochondrialen DNA- (mtDNA) Modifikationen der NOD/LtJ Mitochondrien variieren gegenüber denen des C57BL/6J Stammes in zwei Enzymen der Atmungskette, der NADH

Dehydrogenase 3 und der Cytochrom C Oxidase sowie in der tRNA für Arginin¹⁶⁵. Tiere des konplastischen B6xmtNOD Mausstammes wurden anschließend mit männlichen APP/PS1-B6 Mäusen gekreuzt, um in ihren Nachkommen eine AD-Pathologie zu induzieren. Diese Mäuse konnten dann für die Analyse des Einflusses von spezifischen mitochondrialen DNA-Modifikationen auf die mikrogliale Aktivierung im Verlauf bei der AD verwendet werden (Abb.: 5).

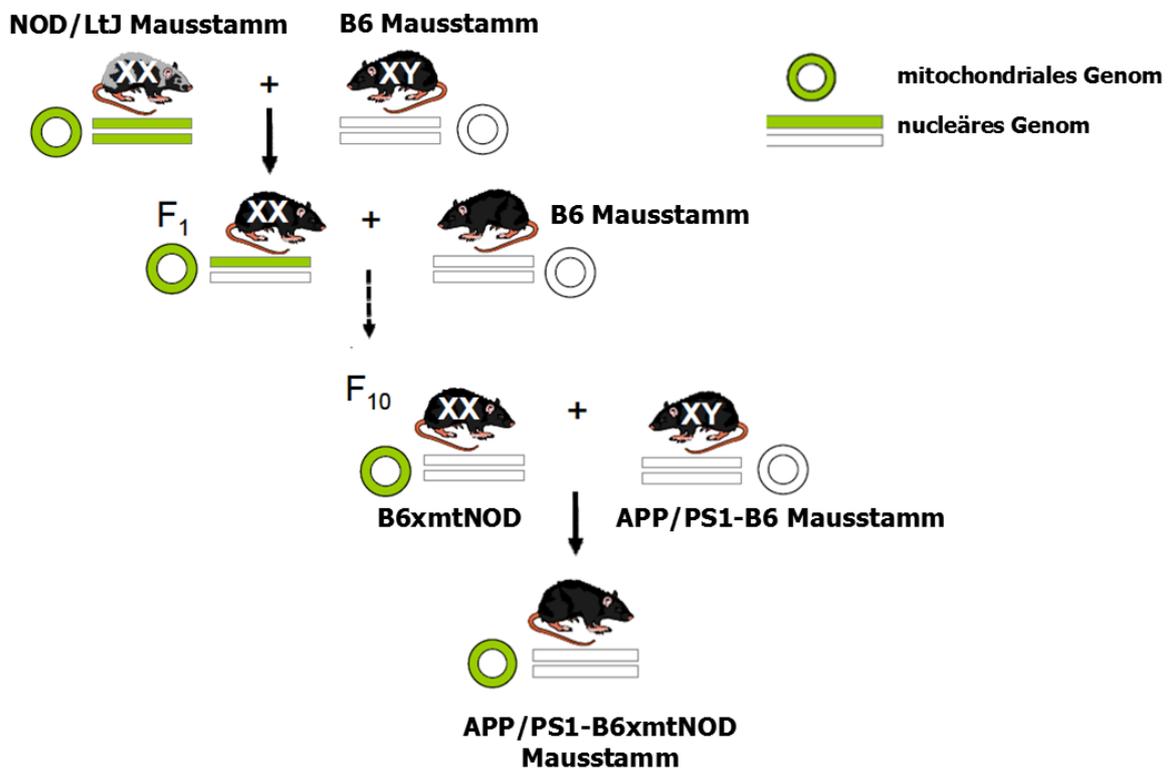


Abb. 5: Kreuzungsschema für die Generierung des APP/PS1-B6xmtNOD Mausmodells, das die mitochondrialen DNA-Varianten der NOD/LtJ Mauslinie im nukleären genetischen Hintergrund des C57BL/6 (B6) Inzuchtstammes besitzt. Verpaarung von männlichen B6 Tieren mit weiblichen NOD/LtJ Mäusen. Die weiblichen Nachkommen wurden fortlaufend mit B6 Tieren über mindestens 9 Generationen in den genetischen B6-Hintergrund zurückgekreuzt. Anschließend wurden weibliche Tiere der resultierenden mitochondrial konplastischen B6xmtNOD Mauslinie mit APP/PS1-B6 Mäusen verpaart, um in ihren Nachkommen eine AD-relevante Pathologie zu induzieren.

5. Cx3CR1/eGFP-B6: Jung et.al.¹⁶⁶

Hierbei handelt es sich um einen Mausstamm, bei dem Leukozyten einschließlich der Mikroglia das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des endogenen Cx3CR1-Promotors exprimieren. Dieser Mausstamm besitzt den genetischen Hintergrund der C57BL/6 Mauslinie. Durch die Expression des GFP sind die Mikroglia in der Fluoreszenzmikroskopie gut identifizierbar. In der vorliegenden Arbeit diente das

Mausmodell sowohl für die Generierung der Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD Mauslinie sowie auch als Knochenmarksdonor für die Generierung der entsprechenden chimären Mäuse.

6. Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD:

Hierbei handelt es sich um einen Mausstamm, der durch die Verpaarung von Tieren der Mauslinien Cx3CR1eGFP-B6 und B6xmtNOD erzeugt wurde. Tiere des Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD Mausstammes enthalten somit GFP markierten Leukozyten mit spezifisch mitochondrialen Veränderungen der NOD/LtJ Mauslinie. Der Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD Mausstamm war als Knochenmarksdonor für die Bildung von chimären Mäusen mit spezifischen Veränderungen im mitochondrialen Genom der Mikroglia vorgesehen.

Alle Tiere der einzelnen beschriebenen Mausmodelle wurden in einer kontrollierten klimatisierten Umgebung in einem Hell-/Dunkelzyklus von 12h mit freiem Zugang zu Nahrung (SNIFF, Deutschland) und Wasser gehalten. Jeder durchgeführte Versuch sowie Haltung und Züchtung wurden von den Behörden des Landes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (LALLF, LAGuS und VLA Rostock).

3.2 Methoden

3.2.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Zucht der für die Untersuchungen benötigten APP/PS1 transgenen Tieren erfolgte bei jedem verwendeten Mausmodell durch die Verpaarung eines Transgen-negativen Weibchens mit einem heterozygoten Transgen-positiven Männchens. Die Nachkommen der Verpaarungen konnten demnach sowohl das Transgen beinhalten, als auch kein Transgen exprimieren. Aus diesem Grund war es notwendig, die Transgen-negativen von den Transgen-positiven Tieren vor weiteren Analysen zu unterscheiden. Die Genotypisierung der Nachkommen wurde in einem standardisierten Verfahren auf Grundlage der Polymerase Kettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) durchgeführt. Dazu wurde von den Mäusen im Alter von 20 Tagen eine Schwanzspitzenbiopsie vorgenommen. Nach Zugabe von jeweils 200 µl Mausschwanz-Lysepuffer sowie 3 µl Proteinase K inkubierten die Schwanzabschnitte bei 55°C und 300 rpm über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Schwänze zur Inaktivierung der Proteinase K für 30 min auf 95 °C erhitzt. Danach erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 13000 rpm und 4 °C für 20 min. Von 1 µl Überstand, der die genomische DNA enthält, wurde eine PCR mit spezifischen Primern (APP_{swe} for/rev) (3.1.6) für das humane APP-Transgen durchgeführt. Die PCR erfolgte im Thermocycler nach dem folgenden Protokoll:

	Temperatur	Inkubationszeit	
erste Denaturierung	95°C	5min	
Denaturierung	95°C	45s	35x Zyklen
Annealing	62°C	45s	
Elongation	72°C	45s	
finale Elongation	72°C	5min	
Pause	4°C	∞	

Durch die Bindung der in der PCR genutzten spezifischen Primern für das humane APP-Transgen wurde ein 250 bp langes Fragment amplifiziert, welches im 2%-igen Agarosegel detektiert wurde. Alle durchgeführten PCR's erfolgten mit Positiv- und Negativkontrolle, wobei die DNA durch eine positive Probe bzw. durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt wurde.

3.2.2 Präparationen des Hirngewebes

Für die Präparation von Hirngewebe, an denen immunhistochemische sowie Proteinanalysen durchgeführt werden sollten, wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation zu den definierten Zeitpunkten getötet und anschließend transkardial mit 20 ml 1x PBS perfundiert. Danach erfolgte die Entnahme des Gehirns. Dabei wurde eine Hemisphäre, die für IHC-Analysen vorgesehen war, für mindestens eine Woche in 4%-igen PFA-Puffer fixiert, während die andere Hemisphäre in flüssigen Stickstoff (-196°C) schockgefroren und anschließend bei -80°C für folgende Proteinanalysen gelagert wurde.

Bei der Gewebepräparation für Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz wurden die Tiere an den definierten Zeitpunkten durch zervikale Dislokation getötet. Unverzüglich danach erfolgte an diesen Tieren die transkardiale Perfusion mit 20 ml 1xPBS und mit darauffolgenden 20 ml 4%-igen PFA-Puffer. Im Anschluss daran fand die Hirnentnahme statt. Entsprechend der geplanten Analysen wurde dabei nur eine Hemisphäre oder das gesamte Gehirn für anschließend 24 h in 4% iger PFA-Lösung fixiert. Danach durchliefen die Proben einen Saccharosegradienten, indem sie zuerst für 24 h in 15% Saccharoselösung gelagert wurden und darauf für weitere 24 h in 25% Saccharoselösung verblieben.

Nach Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation erfolgte die Gewebepräparation für die Bestimmung des zerebralen ATP-Gehaltes. Dafür wurde das gesamte Gehirn der Mäuse entnommen und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 6000 rpm für 12 s mit Hilfe des Precellys 24 Homogenisator homogenisiert.

3.2.3 Immunhistochemie (IHC)

Die Methode der Immunhistochemie diente in der vorliegenden Arbeit sowohl zur Analyse der temporären und spatialen mikroglialen Aktivierung sowie deren Auswirkung auf die A β -Pathologie in den verschiedenen AD-Mauslinien mit zerebraler β -Amyloidose.

Nach mindestens einwöchiger Fixierung der für die IHC vorgesehenen Hemisphären in 4%-iger PFA-Lösung erfolgte in der Histokinette die Entwässerung der Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe (75%, 80%, 96% Ethanol) und Xylol bis hin zu heißem Paraffin. Danach wurden die Hemisphären auf dem Einbetttisch in Paraffin eingebettet. Von den nun in Paraffinblöcken vorliegenden Hemisphären wurden 4 μ m dicke Hirnschnitte mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms angefertigt. Nach Streckung der Schnitte in einem Wasserbad (~40 °C) wurden sie auf Objektträger aufgezogen und für mindestens 1 h bei 60 °C angetrocknet. Alle durchgeführten Färbungen erfolgten im BondMax-Färbeautomaten.

Für die immunhistochemische A β -Färbung wurden die Hirnschnitte für 5 min mit 98% iger Ameisensäure zur Epitopendemaskierung vorbehandelt und anschließend mit Hilfe des primären A β -Antiköpers anti-human A β clone 6F3D (1:200, 30min, DAKO, Deutschland) sowie des Bond™ Polymer Refine Detection Kits DS9800 (Leica Microsystems GmbH, Deutschland) braun angefärbt.

Die immunhistochemischen Doppelfärbungen der Mikroglia und Plaques erfolgten zunächst analog der A β -Färbung, wobei die Plaques in diesem Fall unter der Verwendung des Bond™ Polymer AP-Red Detection DS9800 Kits (Leica Microsystems GmbH, Deutschland) rot sichtbar dargestellt wurden. Die Mikrogliafärbung erfolgte anschließend auf den gleichen Hirnschnitten. Nach der Epitopendemaskierung mit EDTA-Puffer (pH 8,5) für 20 min wurden die Mikroglia mittels Benutzung des primären Mikroglia-Antikörpers anti-Kaninchen IBA1 (1:1,000, 30min, Wako GmbH, Deutschland) und des Bond™ Polymer Refine Detection Kits DS9800 (Leica Microsystems GmbH, Deutschland) braun visualisiert (21244350).

Im Anschluss an die durchgeführten Färbungen wurden die Hirnschnitte erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% Ethanol) und Xylol dehydriert. Abschließend erfolgte das Aufziehen von Objektgläschen auf die gefärbten Schnitte mit Pertex mittels eines Eindeckautomaten.

3.2.4 Quantitative Analyse der Mikroglia und A β -Plaques

Sowohl für die quantitativen Analysen der A β -vermittelten Mikrogliaaktivierung als auch der amyloiden Ablagerungen wurden die mittels IHC (3.2.3) angefertigten Färbungen zunächst mit Hilfe eines Mirax Slide Scanners (Zeiss Microsystems GmbH, Deutschland) in einer Auflösung von 230 nm/Pixel digitalisiert. Danach erfolgte an den gescannten Hirnfärbungen der Ausschnitt von definierten kortikalen Arealen. Diese wurden dann anschließend mit eigens erstellten halb-automatischen Programmen der AxioVision-Software ausgewertet (21244350).

Das Programm für die Quantifizierung der mikroglialen Verteilung in und um die A β -Plaques anhand der immunhistochemischen Doppelfärbungen basiert auf Grundlage der Separation von Mikroglia und amyloiden Ablagerungen durch verschiedene Farbkanäle: rot für die AP-Red gefärbten Plaques, grün für die DAB-gefärbten Mikroglia, gelb für überlagerte Flächen von Plaques und Mikroglia sowie blau für den Hintergrund (Abb.: 6B₁). In den resultierenden Falschfarbenbildern identifiziert das Programm zuerst die A β -Plaques und bestimmt anschließend die Plaquefläche in μm^2 . Im folgenden Schritt legt die Software um die Plaques ein Rechteck, dessen Fläche in Abhängigkeit vom geometrischen Schwerpunkt der jeweiligen Plaques erstellt wird (Abb.: 6B₂). Danach erfolgt in diesem definierten Viereck die Bestimmung der Fläche aller enthaltenden Mikroglia in μm^2 (Abb.: 6B₃). Anschließend wird

das Verhältnis der Plaqueflächen zu den ermittelten Mikrogliaflächen errechnet. Die so erhaltenen Daten umfassen somit neben der Größe des untersuchten kortikalen Bereiches, die in diesem Areal enthaltenden Plaques und deren Größen sowie die jeweiligen assoziierten mikroglialen Flächen um die einzelnen Plaques als auch die prozentualen Verhältnisse von Plaqueflächen zur entsprechenden Mikrogliaflächen.

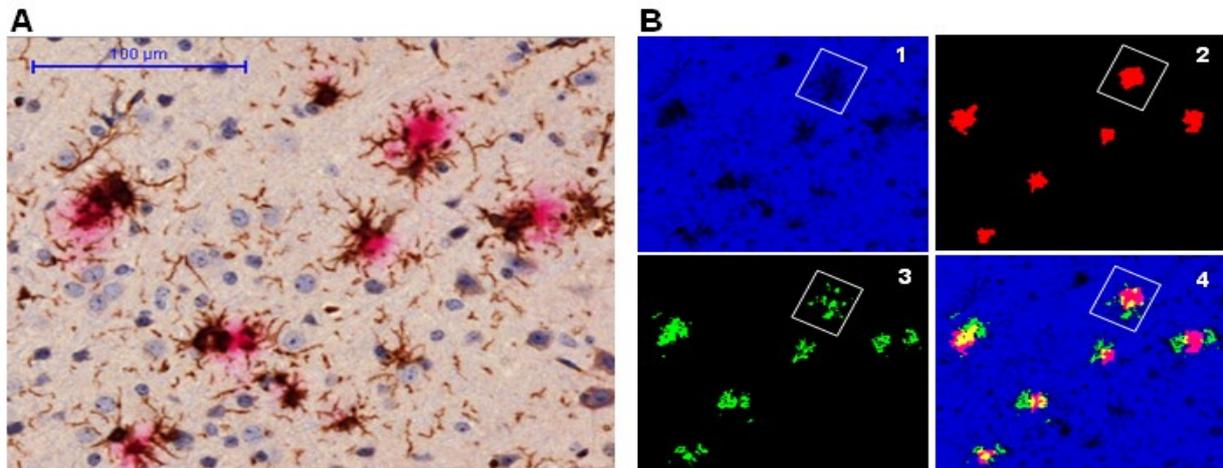


Abb. 6: Darstellung der Digitalisierung der immunhistochemischen Doppelfärbung mit Trennung der A β -Plaques und Mikroglia durch verschiedene Farbkanäle. A) Immunhistologische Doppelfärbung von A β -Plaques (rot) und Mikroglia (braun), B) Falschfarbendarstellung von Plaques und Mikroglia. 1: Ausschnitt eines analysierten Kortexareal in blau, 2: amyloide Plaques in rot dargestellt, umgeben vom schwerpunktabhängigen Rechteck, 3: Mikrogliafläche innerhalb des definierten Bereiches um die Plaques in grün dargestellt, 4: Überlagerung der einzelnen Bilder, in der die Mikrogliafläche auf den Plaques in gelb dargestellt ist.

Das für die A β -Färbungen benutzte Programm zur quantitativen Analyse der amyloiden Ablagerungen bestimmte durch eine halb-automatische Identifizierung der angefärbten Plaques in den definierten kortikalen Bereichen deren Anzahl sowie die jeweilige Plaquegröße [μm^2]. Zur Auswertung erfolgte die Normierung aller gewonnenen Daten auf 10 mm^2 definierter Kortex Fläche.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung (IF)

In der vorliegenden Arbeit diente die Methode der Immunfluoreszenzfärbung sowohl der Kontrolle des chimären Status der Knochenmark-transplantierten Mäuse als auch der *in vivo*-Analyse der mikroglialen A β -Phagozytosefähigkeit.

Die für die Testung einer erfolgten Generierung von Knochenmarkchimären Mäusen entnommenen und mit PFA-fixierten Hirnproben wurden anschließend mit einem

Saccharosegradienten vorbehandelt (3.1.7.1) Nach der vollständigen Entfernung des PFA's durch den Saccharosegradienten wurden die Hirnproben intensiv mit Aqua dest. gespült und danach auf einer Korkunterlage im Gefiermedium (TissueTek) eingebettet. Im Anschluss erfolgte mit Hilfe eines Kryostaten die Anfertigung von 16 µm dicken Gefrierschnitten. Die erhaltenen Schnitte konnten in natriumazidhaltigem 1xPBS bis zum Färbeprozess gelagert werden. Die Immunfluoreszenzfärbungen von Mikroglia bzw. Aβ-Plaques in den Hirnschnitten erfolgte manuell und frei schwimmend in geeigneten Gefäßen nach dem Protokoll in Tabelle 1. Nach vollzogener Färbung wurden die Hirnschnitte mit DePex eingedeckelt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (LSM700, Zeiss, Deutschland) ausgewertet.

Schritt	Reagenz		Zeit	Temperatur
	Mikroglia-Färbung	Aβ-Färbung		
Waschen	1xPBS	1xPBS	3x 15min	RT
Blocken	5% normales Ziegenerum	5% normales Ziegenerum	60min	RT
Waschen	1xPBS	1xPBS	3x 15min	RT
prim. AK-Inkubation	Anti-Maus IBA1 (1:500)	Anti-human Aβ (clone 6E10) (1:500)	90min	4°C
Waschen	1xPBS	1xPBS	3x 15min	RT
sek. AK-Inkubation	Cy3 Ziege Anti-Kaninchen IgG (1:500)	Cy3 Ziege Anti-Maus IgG (1:500)	60min	RT
Waschen	1xPBS	1xPBS	3x 15min (dunkel)	RT

Tabelle 1: Schema der Mikroglia- und Aβ-Färbung

Für die Darstellung der mikroglialen Aβ-Phagozytose mittels Immunfluoreszenz wurden 2×10^5 primäre Mikroglia auf einen mit Poly-D-Lysin beschichteten Objektträger ausgesät und in einer 6-Loch Zellkulturplatte für 24 h mit 500 nM FITC-markiertem Aβ₄₂ enthaltenen DMEM Medium (3.1.7.2) inkubiert. Danach erfolgte die Fixierung der Mikroglia durch Behandlung mit 2%-iger PFA-Lösung für 5 min und eiskaltem Methanol für weitere 5 min. Anschließend wurde die Anfärbung der Mikroglia nach demselben Protokoll wie für die Mikrogliafärbung (siehe Tabelle 1) durchgeführt und mit Hilfe des Vectashield Kits eingedeckelt. Die Visualisierung der Färbung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (LSM700, Zeiss, Deutschland).

3.2.6 Bestimmung der zerebralen A β ₄₂-Konzentration mittels ELISA

Für die Ermittlung der zerebralen Konzentration von sowohl löslichen A β ₄₂-Monomeren / Oligomeren als auch von unlöslichen A β ₄₂-Protofibrillen / Fibrillen wurde die Methode des Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) angewandt. Bei dem verwendeten humanen hAmyloid β 42 Elisa der Firma The Genetics Company (Schweiz) handelt es sich um einen Sandwich-ELISA.

Die Quantifizierung des A β ₄₂-Gehaltes erfolge in den entnommenen Hemisphären, die in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden (3.2.2.). Nach Zugabe von 500 μ l RNA-later inkubierten die Hemisphären zum Auftauen für 2 h auf Eis. Anschließend wurden die Hemisphären in PrecellLys Homogenisierungsröhrchen, die vier Keramikkügelchen beinhalteten, überführt und mit Hilfe des PrecellLys Homogenisators bei 6000 rpm für 12 s homogenisiert. Danach wurden circa 20 mg des Hirnhomogenates in ein 2,0 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit einem definierten Volumen (1:50) an 1 M Carbonat-Puffer (pH 11,5) sowie einer Homogenisationskugel versehen. Im Anschluss erfolgte eine erneute Homogenisierung der Proben für 5 s bei 5000 rpm im PrecellLys Homogenisator. Zur Trennung der löslichen (Monomere / Oligomere) und unlöslichen (Protofibrillen / Fibrillen) A β ₄₂-Spezies wurden die Proben hinterher für 90 min bei 24000 g und 4 °C zentrifugiert.

Der resultierende Überstand wurde in ein neues 2,0 ml Eppendorfgefäß überführt und mit einem Volumen von 1:1,6 mit 8 M Guanidin-Puffer versehen. Nach erneuter Zentrifugation (90 min, 24000 g, 4 °C) wurde der Überstand gesammelt. Dieser Überstand repräsentiert die Puffer-lösliche Fraktion, in dem sich die löslichen A β ₄₂ -Monomere / Oligomere befinden.

Zur Extraktion der aggregierten A β ₄₂-Formen (Protofibrillen / Fibrillen) erfolgte zum, nach der Zentrifugation im Carbonat-Puffer, entstandenen Pellet die Zugabe von 8 Volumenanteilen (anfängliches Probengewicht) von 5 M Guanidin-Puffer. Danach wurde die Probe kurz gevortext und für 3 h bei 1400 rpm, RT geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (20 min, 24000 g, 4 °C). Der resultierende Überstand, der als Guanidin-lösliche Fraktion bezeichnet wird und in dem sich die unlöslichen Protofibrillen / Fibrillen des A β ₄₂ befinden, wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Die Bestimmung der Proteingehalte aller Proben erfolgte mit Hilfe des Nanodrops 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Der hAmyloid β 42 Elisa zur Ermittlung der zerebralen A β ₄₂ -Konzentrationen wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt (The Genetics Company, Schweiz), wobei die Messung der Extinktionen im ELISA-Platten-Reader (Tecan Reader Infinite 200pro) erfolgte.

3.2.7 Bestimmung der zerebralen ATP-Konzentration

Die Quantifizierung des zerebralen ATP-Gehaltes erfolgte an frisch präparierten Proben des gesamten Gehirns. Dazu wurden die entnommenen Gehirne mittels des Precellys Homogenisators bei 6000 rpm für 12 s homogenisiert (3.2.2.). Anschließend erfolgte die Bestimmung der ATP-Konzentration in den Hirnhomogenaten mit Hilfe eines Luziferin / Luziferase ATP Biolumineszenz Assay Kits (Sigma-Aldrich, Deutschland), der gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt wurde. Für die Lumineszenzmessungen wurde der Infinite200Pro Platten-Reader (Tecan, Schweiz) verwendet.

3.2.8 Präparation der primären Mikroglia

Die für die *in vitro*-Untersuchung der mikroglialen A β -Phagozytosefähigkeit benötigten primären Mikroglia wurden nach dem Protokoll von Horvath *et. al.* mit leichten Modifikationen gewonnen ¹⁶⁷.

Die Präparation erfolgte an zwei bis drei Tage alten Mäusen der B6- sowie B6xmtNOD Zucht. Nach Tötung der Tiere durch Dekapitation wurden die zerebralen Kortizes entnommen und in gekühlten 1xPBS Puffer überführt. Im PBS Puffer erfolgte nach Entfernung der Hirnhäute die Zerkleinerung der Kortizes durch ein steriles Skalpell. Danach wurden die zerschnittenen Teile der Kortizes in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und nach Zugabe von 5 ml 1x Trypsin/EDTA für 15 min bei 37°C verdaut. Der sich im Verlauf des Verdaus gebildeten Überstand wurde verworfen. Zum Pellet, das ab diesem Zeitpunkt gekühlt aufbewahrt wurde, erfolgte die Zugabe von 5 ml DMEM Medium (10% FBS, 1% GlutaMax, 1% Penicillin/Streptomycin), das durch zusätzliche 2,000 Units an DNase ergänzt wurde. Nach mehrmaliger Titration mit einer 5 ml Pipette wurde die Lösung für 30 min auf Eis gelagert, so dass sich die in der Suspension befindlichen Gewebeklumpen absetzen konnten. Anschließend erfolgte die Dekandierung des Überstandes in ein neues 50 ml Falconröhrchen. Die Titration wurde solange wiederholt, bis nach den 30 min der Lagerung auf Eis keine Gewebeklumpen mehr auf dem Boden des Falconröhrchens sichtbar waren. Danach wurde der gewonnene Überstand auf 25 ml mit komplettem DMEM-Medium aufgefüllt und bei 340 g für 15 min zentrifugiert. Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde mit 5 ml DMEM resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellanzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer erfolgte die Aussaat von jeweils 2×10^6 Zellen in eine mit Poly-D-Lysin beschichtete 75 cm²-Kulturflasche. Die so generierten Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert, wobei ein Wechsel des Mediums alle drei bis vier Tage erfolgte. Nach 20 Tagen der Kultivierung wurden die Flaschen bei 250 rpm für 45 min geschüttelt, um die auf einem Astrozytenrasen sitzenden Mikroglia abzutrennen. Danach wurde der an Mikroglia-reiche Überstand abgenommen und bei 340 g für 15 min

zentrifugiert. Die sich nun im Zellpellet befindlichen primären Mikroglia wurden in Medium resuspendiert und für den folgenden A β -Phagozytose Test benutzt.

3.2.9 Messung der A β -Phagozytoseaktivität von primären Mikroglia

Zur Ermittlung der mikroglialen A β -Phagozytoseaktivität wurden jeweils 3×10^4 primäre Mikroglia pro Well in 500 μ l DMEM-Medium (10% FBS, 1% GlutaMax, 1% Penicillin/Streptomycin) in eine mit Poly-D-Lysin beschichtete 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und anschließend mit Fluoreszeinisothiocyanat-(FITC)-markierten A β_{42} in einer Endkonzentration von 500 nM für 6 h bei 37°C und 5% CO $_2$ inkubiert. Nach Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgenommen und die verbliebenen Mikroglia zweimal mit 1xPBS gewaschen. Zum Abtrennen der Mikroglia vom Boden der Zellkulturplatte erfolgte im Anschluss eine Behandlung mit Trypsin für 2-3 min. Danach wurden die abgelösten Mikroglia mit 1 ml DMEM versetzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 340 g für 15 min und die Resuspendierung des Pellets in 1xPBS. Die folgende Quantifizierung der Phagozytoseaktivität erfolgte durch die Messung der Aufnahme des FITC-markierten A β_{42} . Dazu wurde von den behandelten Mikroglia die intrazelluläre Fluoreszenz (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm) mit Hilfe des PARADIGM (Beckman Coulter, USA) bestimmt.

3.2.10 Isolierung von Knochenmarkszellen

Die, für Generierung von chimären AD-Mauslinien, benötigten Knochenmarkszellen wurden aus sechs bis acht Wochen alten Tieren des Cx3CR1/eGFP-B6 bzw. Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD Mausstammens isoliert. Dazu erfolgte nach zervikaler Dislokation die Entnahme des Oberschenkel- und Schienbeinknochens. Nach sorgfältiger Entfernung von Geweberesten wurden die Enden der Knochen abgeschnitten. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Knochen abwechselnd von beiden Enden her mit Hilfe einer 25G Nadel und Spritze mit 5 ml DMEM Medium (10% FBS, 1% GlutaMax, 1% Penicillin/Streptomycin) durchgespült, wobei der Durchfluss in ein 50 ml Falconröhrchen aufgefangen wurde. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min (4 °C) und die Resuspendierung des Pellets in 10 ml Medium. Nach mehrmaliger Titration mit einer 10 ml Pipette wurde die Lösung auf 50 ml mit Medium aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellanzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 rpm für 10 min (4 °C) wurde das Pellet in 1xPBS gelöst, so dass eine Endkonzentration von 6×10^6 Knochenmarkszellen/100 μ l PBS vorlag.

3.2.11 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standard Fehler des Mittelwertes (SEM, engl. standard error of the mean). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Student-t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der temporären und spatialen mikroglialen Aktivierung im APP/PS1-C57BL/6J Mausmodell der AD

Zur Aufklärung der genauen Rolle der Mikroglia während der AD-Pathogenese wurde im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit die zeitliche und räumliche mikrogliale Aktivierung in Assoziation zu den amyloiden Ablagerungen im APP/PS1-C57BL/6J (APP/PS1-B6) (3.1.8) Mausmodell der AD untersucht ¹⁶³. Um dabei eine optimale Auflösung von möglichen altersbedingten Veränderungen in der mikroglialen Reaktion auf die A β -Plaques zu bekommen, wurden geschlechtsunabhängig jeweils mindestens sechs APP/PS1-B6 Mäuse, in kurzen Zeitintervallen von 25 Tagen, zwischen einem Alter von 50 bis 200 Tagen analysiert. Die Untersuchungen erfolgten dabei qualitativ mit einer geeigneten immunhistochemischen Doppelfärbung, die die A β -Plaques in rot zusammen mit den Mikroglia in braun auf den Hirnschnitten der zu untersuchenden Tiere darstellt (3.2.3). Die quantitative Analyse der mikroglialen Aktivierung wurde mit einer in unserem Labor entwickelten Hochdurchsatz-Methode durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Digitalisierung der Doppelfärbungen von amyloiden Plaques und Mikroglia mit anschließender Auswertung der so gewonnenen digitalen Daten über ein eigens erstelltes halb-automatisches Programm der Axio-Vision-Software. Dieses errechnet die Plaqueanzahl, Plaquefläche, Mikrogliafläche und den Prozentsatz der mikroglialen Bedeckung zur entsprechenden Plaquefläche (3.2.4) ¹⁶⁸.

Wie schon durch Radde *et.al.* berichtet, waren während der Analyse erste auftretende amyloide Ablagerungen in 50 Tage alten APP/PS1-B6 Tieren nachweisbar (Abb.: 7A) ¹⁶³. In der Nähe dieser frühzeitig gebildeten, in ihrer Größe noch relativ kleinen, A β -Plaques befanden sich bereits einzelne aktivierte Mikroglia (Abb.: 7D). Mit zunehmendem Alter stieg die Plaquedichte in den kortikalen Bereichen der Tiere dramatisch an. Dieser Anstieg ging mit einer erhöhten Mikrogliose um die amyloiden Plaques einher (Abb.: 7B, C). Dabei waren ausnahmslos alle mit Hilfe des A β -Antikörpers (clone 6F3D) rot angefärbten A β -Plaques mit Mikroglia umgeben. Im Gegensatz zu den kleinen weit verzweigten Mikroglia im restlichen Hirnparenchym zeigten diese in unmittelbarer Umgebung von A β -Plaques gelegenen Mikroglia einen aktivierten Phänotyp mit vergrößerten Zellsoma und amöboider Form. Die Anzahl aktivierter Mikroglia scheint mit steigender Plaquefläche zuzunehmen, wobei einige Mikroglia teilweise auch den Kern der amyloiden Ablagerungen infiltrierten. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass die Plaque-assoziierte Mikrogliafläche bei einer Untergruppe von kleineren, womöglich neuentstandenen Ablagerungen größer war als bei großflächigen A β -Plaques (Abb.: 7E, F).

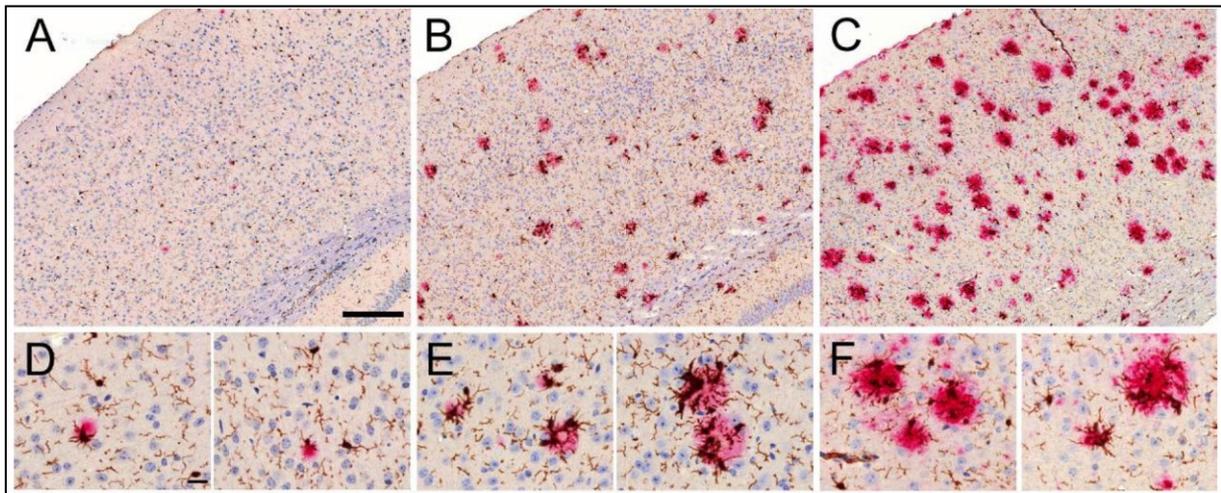


Abb. 7: Altersabhängige Veränderungen der mikroglialen Plaquebedeckung in den APP/PS1-B6 Mäusen. A) Auftreten von ersten A β -Plaques in einem Alter von 50 Tagen. B) Dramatischer Anstieg der A β -Ablagerungen beim Alter von 125 Tagen, C) bis hin zu 200 Tagen. Vergrößerung (D-F) markiert die Assoziation von Mikroglia zu den A β -Plaques. Die mikrogliale Bedeckung erhöht sich bis zum Tag 125 (E), danach reduziert sich die Fläche von aktivierten Mikroglia um die großflächigen A β -Ablagerungen, während kleinere Plaques eine relativ starke mikrogliale Komponente aufweisen (publiziert in ¹⁶⁸).

Nachdem eine altersabhängige Aktivierung der Mikroglia, ausgelöst durch die Plaqueablagerungen, mittels Immunhistochemie (IHC) gezeigt wurde, erfolgte die quantitative Analyse der temporären und spatialen Beziehung von Mikroglia und A β -Plaques zu den verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung mit Hilfe des semi-automatisierten Programm der AxioVision Software (3.2.4).

Die Quantifizierung von definierten kortikalen Bereichen ergab einen konstanten Anstieg der Plaqueanzahl bis zum 200. Tag. Die 75 Tage alten APP/PS1-B6 Tiere entwickelten bereits mehr als die 10-fache Menge an A β -Ablagerungen gegenüber 50 Tage alten Tieren. Danach stieg die Plaquedichte bis auf 547 pro 10 mm² Kortexfläche bei 200 d alten Tieren an (Abb.: 8A). Parallel dazu erhöhte sich jedoch die durchschnittliche Plaquegröße nur bis zum 150. Tag, wobei sie ein Maximum von ungefähr 1100 μ m² erreichte (Abb.: 8B). In dem Zeitraum von 50-200 d war eine kontinuierliche Zunahme der gesamten mikroglialen Fläche erkennbar. Dabei erhöhte sich die Fläche der Mikroglia pro 10 mm² Kortexfläche um circa das 300-fache von 684 μ m² am Tag 50 bis auf 202919 μ m² am Tag 200 (Abb.: 8C). Die mikrogliale Fläche normiert auf die Anzahl der A β -Plaques vergrößerte sich bis zum 150. Tag. Ab diesem Zeitpunkt blieb die errechnete durchschnittliche mikrogliale Fläche pro A β -Plaque konstant und lag bei rund 345 μ m² (Abb.: 8D). Im Verlauf der Analyse traten bei allen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern auf.

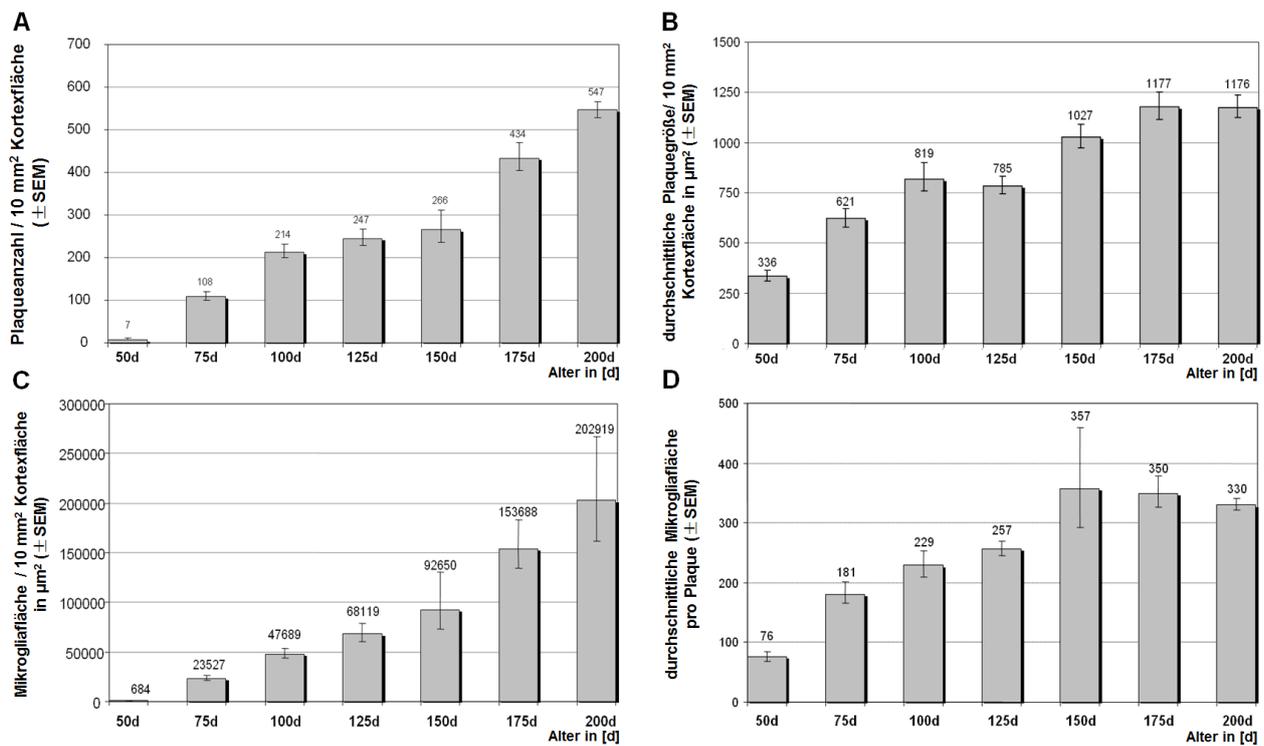


Abb. 8: Analyse der Plaqueanzahl, Plaquegröße und mikroglialer Fläche in den APP/PS1-B6 Mäusen im Alter von 50-200 d in untersuchten Zeiträumen von 25 Tagen. Quantifizierung von A) Plaqueanzahl, B) durchschnittliche Plaquegröße (μm^2), C) mikroglialer Fläche und D) mikroglialer Fläche normiert auf die Anzahl der A β -Plaques in den Neokortizes von APP/PS1-B6 Mäusen (alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert). Über den gesamten Analysezeitraum stieg die Plaqueanzahl (A) wie auch die durchschnittliche Plaquegröße (B) konstant an, welche jedoch im Alter von 150 d ein Maximum erreichte. Die mikrogliale Fläche vergrößerte sich stetig über die ganze Untersuchungsperiode, wobei die errechnete durchschnittliche Fläche der Mikroglia, die die einzelnen amyloiden Ablagerungen umgaben ein Plateau bei 150 d, 175 d und 200 d einnahm. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. (publiziert in ¹⁶⁸).

Zur quantitativen Analyse der räumlichen Beziehung zwischen A β -Plaques und Plaque-assoziierten Mikroglia wurden die prozentualen Verhältnisse der einzelnen Plaqueflächen [μm^2] und den dazugehörigen, ermittelten Mikrogliaflächen [μm^2] bestimmt und anschließend gegen die jeweilige Plaquefläche aufgetragen. Dabei war mit steigendem Alter die Entstehung zweier Plaquepopulationen mit verschiedener Mikrogliaabdeckung feststellbar. Neben dem Hauptteil an Plaques, die mit einer geringen Mikrogliafläche (< 50%) bedeckt waren, ist eine zweite kleinere Gruppe an Plaques entstanden, die eine massive Mikrogliaabdeckung (> 50%) besaß (Abb.: 9A). Bei den über den Zeitraum wachsenden Plaques zeigte sich, dass die Mikrogliafläche weitestgehend konstant blieb, wohin gegen kleinere womöglich neu entstehende A β -Ablagerungen mit großen Mengen an Mikroglia assoziiert waren. Die zusätzliche Quantifizierung der Plaqueanzahl, bei der wenigstens 50% der Plaquefläche mit Mikroglia bedeckt sind, ergab einen kontinuierlichen Anstieg bis 125

Tage. Im weiteren Untersuchungszeitraum blieb der Wert der relativen Plaqueanzahl mit wenigstens 50% Mikrogliaabdeckung weitestgehend konstant mit einem leichten Rückgang bei 175 d (Abb.: 9B).

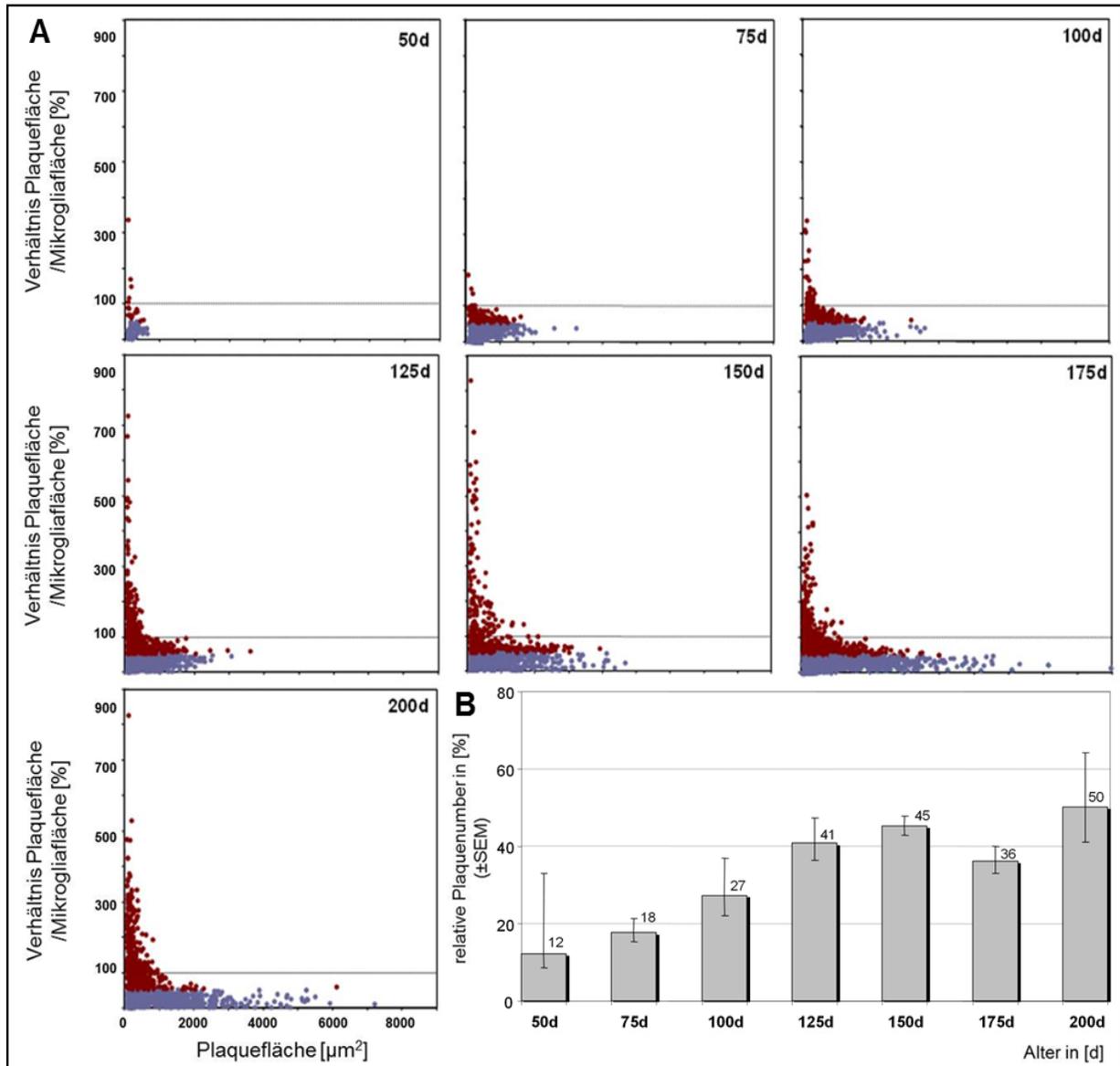


Abb. 9: A) Entstehung zweier Plaquepopulationen in den APP/PS1-B6 Tieren im Untersuchungszeitraum von 50-200 Tagen. Die Berechnungen der Mikrogliaabdeckung zu entsprechenden Plaqueflächen resultierten in der Entstehung zweier verschiedener Gruppen von Plaques. Flächenmäßig größere Plaques zeigten ein Verhältnis von Plaque- zu Mikrogliafläche von unter 50% (blaue Punkte). Darüber hinaus wiesen kleinere, neu gebildete Plaques ein Verhältnis zwischen Plaquefläche zu Mikrogliaabdeckung von weit über 50% auf (dunkelrote Punkte).

B) Altersabhängige Veränderung der relativen Plaqueanzahl, die mit wenigstens zu 50% von Mikroglia bedeckt waren im APP/PS1-B6 Mausmodell. Die Quantifizierung der Plaques, die über die Hälfte mit Mikroglia bedeckt waren, zeigte einen kontinuierlichen Anstieg bis 125 Tagen. Im weiteren Verlauf bis 200 Tagen erreichte die relative Plaqueanzahl mit wenigstens 50% Mikrogliaabdeckung ein Plateau. Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. (publiziert in ¹⁶⁸).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen mikroglialer Bedeckung und dem Wachstum der amyloiden Ablagerungen zu verifizieren, erfolgte im nächsten Schritt die Untersuchung der Plaquegrößen. Dazu wurden die A β -Plaques abhängig von ihren Größen in drei separate Gruppen unterteilt: **1)** klein, $\leq 400 \mu\text{m}^2$; **2)** mittel, $401 \mu\text{m}^2 - 700 \mu\text{m}^2$; **3)** groß, $>700 \mu\text{m}^2$ ¹³⁸. Im Alter von 50 d, mit dem Auftreten der ersten Plaques, konnten, wie erwartet, alle entstanden Ablagerungen in die Gruppe mit der Größe unter $400 \mu\text{m}^2$ eingeordnet werden. Gemäß der steigenden durchschnittlichen Plaquegröße (Abb.: 8B) zeigte sich im weiteren Verlauf der Analyse bis zum 100. Tag eine Zunahme der großflächigen Plaques bei gleichzeitiger Abnahme des Anteil an kleinen A β -Ablagerungen. Zum Zeitpunkt von 125 d war jedoch ein Anstieg der relativen Anzahl an kleinen Plaques und ein Abfall der Fraktion von großen A β -Plaques erkennbar (Abb.: 10). In dem Zeitraum von 150 bis 200 d, bei dem trotz gleichbleibender durchschnittlicher Mikrogliafläche pro A β -Ablagerung (Abb.: 8D) der höchste Anteil an hauptsächlich kleineren Plaques mit über 50% mikroglialer Bedeckung feststellbar war, blieb die relative Anzahl der kleinen und großen A β -Plaques weitestgehend konstant, mit einem leicht tendenziellen Anstieg der unter $400 \mu\text{m}^2$ großen amyloiden Ablagerungen. Im Gegensatz zu den sich veränderten Verhältnissen von kleinen und großen Ablagerungen erreicht der prozentuale Anteil der mittleren Plaques ein Plateau ab dem 75. Tag und liegt über die restliche Untersuchungsperiode zwischen 25-30% der Gesamtplaqueanzahl (Abb.: 10).

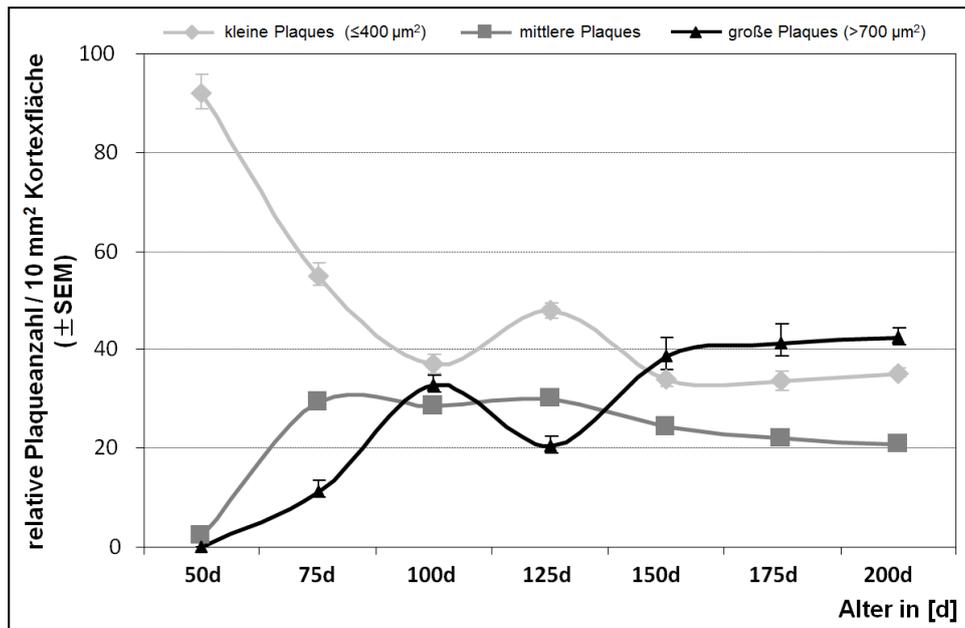


Abb. 10: Analyse der Plaquegrößen-Verteilung in den APP/PS1-B6 Mäusen im Alter von 50-200 d. Im Verlauf des Untersuchungszeitraums zeigte sich eine Fluktuation in der relativen Plaqueanzahl zwischen den verschiedenen Plaquegrößen-Gruppen. Einem dramatischen Abfall des Anteils an kleinen Ablagerungen (gestrichelte Linie) zu den frühen Zeitpunkten folgte eine geringe Zunahme am Tag 125. Der prozentuale Anteil an großen A β -Plaques (durchgezogene Linie) entwickelte sich im Vergleich zu den kleinen Ablagerungen in entgegengesetzter Richtung, mit einem steilem Anstieg zwischen 50 und 100d sowie einen leichtem Rückgang bei 125 d. Danach blieben sowohl die Anzahl an kleinen und großen Plaques relativ konstant, wohingegen der Anteil an mittelgroßen Ablagerungen (gepunktete Linie) bereits ab dem 75. Tag fast unveränderlich blieb. Alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (publiziert in ¹⁶⁸).

4.2 Einfluss des nukleären genetischen Hintergrundes auf die mikrogliale Aktivierung im Verlauf der AD

Da die Funktionen des angeborenen Immunsystems, zu dem auch die Mikroglia gehören, stark von der genetischen Konstitution jedes einzelnen Individuums abhängt, ist die Untersuchung des Einflusses der genetischen Heterogenität auf die mikrogliale Aktivierung während der AD-Pathogenese von Bedeutung. Dabei kann die Analyse des beobachteten Effekts des genetischen Hintergrundes von AD-Mausmodellen auf den Krankheitsverlauf, ein geeignetes Mittel zur Identifizierung von genetischen Faktoren, die bestimmte charakteristische Merkmale der AD-Pathologie regulieren, darstellen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des genetischen Hintergrundes zweier verschiedener Mausinzuchtstämme mit zerebraler β -Amyloidose auf die mikrogliale Aktivierung vergleichend untersucht.

Darüber hinaus hilft das Wissen über eine mögliche Beeinträchtigung der mikroglialen Reaktivität in Abhängigkeit von der genetischen Konstitution der Mausmodelle bei der korrekten Interpretation von Forschungsergebnissen, die basierend auf der Verwendung von verschiedenen transgenen AD-Mausstämmen ermittelt wurden ²¹.

Zur Untersuchung des Einflusses des nukleären genomischen Hintergrundes auf die Aktivierung von Mikroglia und ihrer Assoziation mit der A β -Pathologie wurde das APP/PS1-Mausmodell in einen weiteren Inzuchtstamm, dem FVB/N (FVB) Mausstamm (3.1.8), zurückgekreuzt. Die Entscheidung, die FVB Linie zu benutzen, lag darin begründet, dass sich ihre nukleäre DNA wesentlich vom B6 Mausstamm unterscheidet und hinsichtlich altersbedingter ZNS-Erkrankungen gut charakterisiert ist ^{169,170}. Zur Analyse der temporären und spatialen mikroglialen Antwort wurden APP/PS1-FVB- und APP/PS1-B6 Mäuse, in einem Alter von 50 bis 200 Tagen, in kurzen Zeitintervallen von 25 Tagen untersucht. Die Analysen erfolgten dabei wiederum mit Hilfe der IHC und des semi-automatisierten Verfahrens zur quantitativen Charakterisierung der mikroglialen Aktivität. Die Tieranzahl betrug dabei jeweils mindestens fünf Mäuse pro Zeitpunkt und transgener Mauslinie, wobei keine Gender-spezifischen Unterschiede einbezogen wurden. Mit der Entstehung der ersten amyloiden Plaques konnte in beiden AD-Mausstämmen eine aufkommende Mikrogliose beobachtet werden. Bei den APP/PS1-B6- als auch bei den -FVB Tieren stieg die Mikrogliose mit zunehmendem Alter stark an, wobei alle immunhistochemisch angefärbten Ablagerungen mit Mikroglia umgeben waren. Im Vergleich zu den nicht mit A β -Plaques interagierenden Mikroglia zeigten die Plaque-assoziierten Mikroglia wiederum einen wenig verzweigten sowie vergrößerten Zellkörper. Interessanterweise war bereits auf den immunhistochemischen Doppelfärbungen der Hirnproben bei den transgenen FVB Mäusen im mittleren und hohen Alter ein größerer mikroglialer Anteil in der Nähe der A β -Plaques im Vergleich mit den gleichaltrigen APP/PS1-B6 Tieren, erkennbar (Abb.: 11).

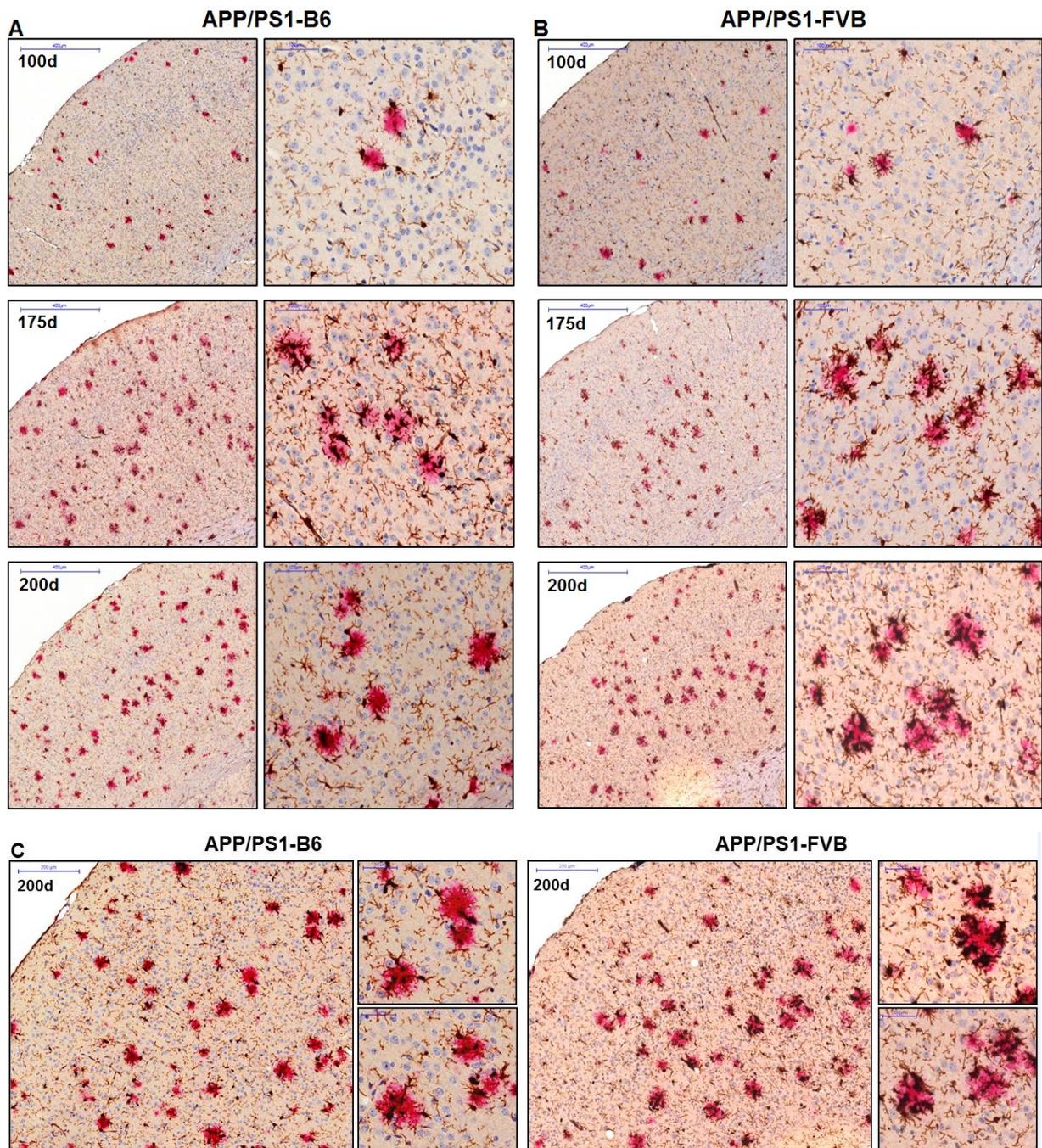


Abb. 11: Charakterisierung der mikroglialen Aktivierung infolge der zerebralen β -Amyloidose in den APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB Mäusen im Alter von 50-200 d. A) Repräsentative immunhistochemische Doppelfärbung von Mikroglia (braun) und Plaques (rot) im Kortexbereich in 2x und 25x Vergrößerung von 100 d, 175 d und 200 d alten APP/PS1-B6 Tieren und B) in gleichaltrigen APP/PS1-FVB Mäusen. C) Qualitative Profile der $A\beta$ -vermittelten mikroglialen Aktivierung im Gehirn von 200 d alten Tieren beider APP/PS1-transgener Mausstämme. Die höhere Vergrößerung weist eine geringere Aktivierung von Mikroglia um die $A\beta$ -Plaques in den APP/PS1-B6 Mäusen verglichen mit den APP/PS1-FVB Tieren auf.

Die folgende Quantifizierung der Plaque assoziierten Mikrogliaabdeckung ergab bedeutende Mausstamm-spezifische Unterschiede. Wie schon auf den immunhistochemischen Färbungen sichtbar, konnte eine signifikant höhere durchschnittliche mikrogliale Fläche pro A β -Plaque im Alter von 100 bis 200 d in den APP/PS1-FVB Tieren festgestellt werden. Im Vergleich zu den transgenen Mäusen im B6-Hintergrund waren in diesem Zeitraum die amyloiden Ablagerungen im Durchschnitt mit jeweils circa 40% größerer Mikrogliafläche umgeben. In beiden Mausstämmen stieg die durchschnittliche Mikrogliafläche pro A β -Ablagerung zwischen dem Alter von 50 bis 150 d kontinuierlich an und blieb danach relativ konstant bei ungefähr 349,5 μm^2 pro Plaque in den APP/PS1-B6 Tieren gegenüber 481,5 μm^2 pro Plaque im APP/PS1-FVB Stamm (Abb.:12 A). Ähnlich wie bei der Charakterisierung der mikroglialen Antwort im APP/PS1-B6 Mausmodell konnte auch in den transgenen FVB Mäusen die Entstehung zweier Plaquepopulationen mit unterschiedlicher Mikrogliaabdeckung identifiziert werden. Dabei war mit steigendem Alter die Gruppe an vorwiegend kleinen A β -Plaques mit einer massiven Mikrogliaabdeckung von über 50% in den APP/PS1-FVB Mäusen größer als in den APP/PS1-B6 Tieren (Abb.: 12B). Die Quantifizierung der relativen Plaqueanzahl bei der wenigstens 50% der Plaquefläche mit Mikroglia bedeckt sind, als empirisch definierter Marker der mikroglialen Aktivität, zeigte im transgenen B6 Stamm einen stufenweisen Anstieg bis zu einem Alter von 150 d. Diesem Anstieg folgte ein weitestgehend gleichbleibendes Plateau der Plaqueanzahl zu den späteren Zeitpunkten, bei dem circa 43% der gesamten Plaques eine über 50%-ige Mikrogliaabdeckung aufwiesen. Im APP/PS1-FVB Mausstamm waren dagegen bereits ab dem 75. Tag über 55% der gesamten Plaques mit einer enormen Mikrogliafläche (> 50%) assoziiert. Bis zum Alter von 200 d blieb diese hohe mikrogliale Bedeckung relativ stabil, so dass bei allen untersuchten Zeitpunkten mindestens immer über 55% der amyloiden Ablagerungen zu Hälfte mit Mikroglia bedeckt waren. Eine signifikante höhere relative Plaqueanzahl mit mindestens 50%-iger Mikrogliaabdeckung ergab sich mit Ausnahme des 50 d-Zeitpunktes zu allen anderen Zeitpunkten bei den transgenen FVB-Tieren gegenüber den B6 Mäusen (Abb.:12C).

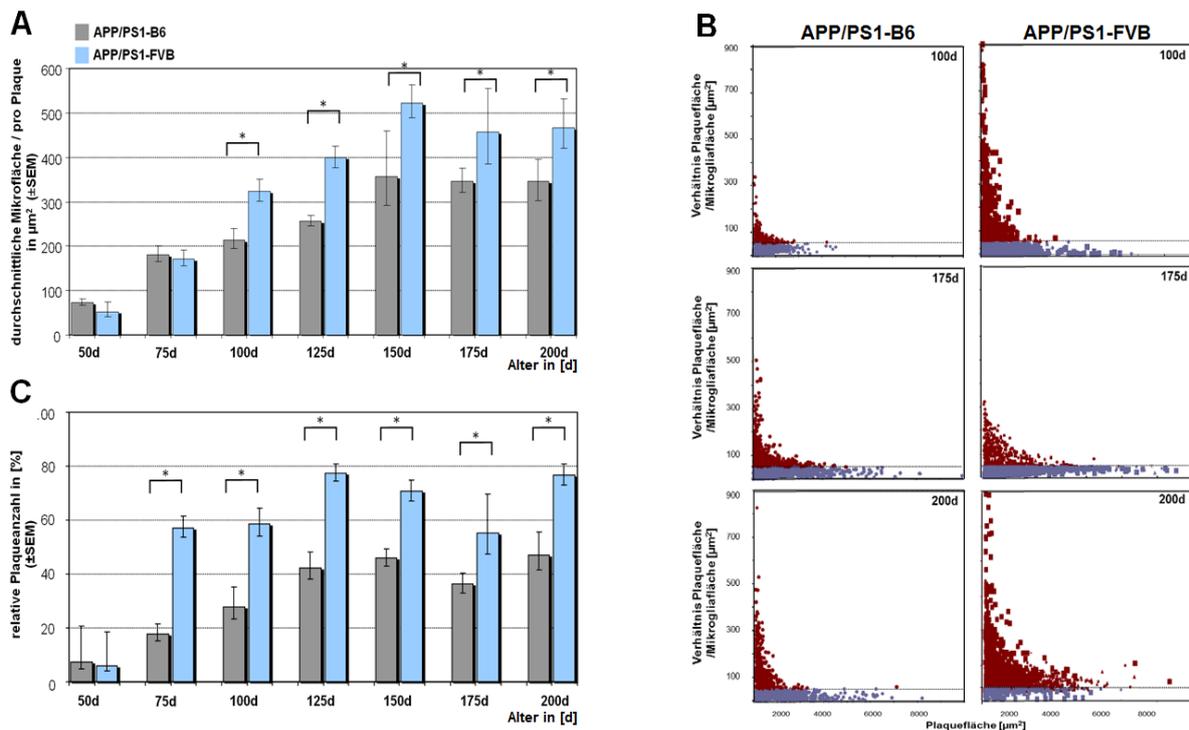


Abb. 12: Mausstamm-spezifische Unterschiede in der mikroglialen Reaktivität zu den amyloiden Ablagerungen in den APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB transgenen Tieren. Zeitabhängige Analysen der A) durchschnittlichen Mikrogliafläche pro A β -Plaques, B) dem Größenverhältnis von Mikrogliafläche zur entsprechenden Plaquesfläche und C) der relativen Plaqueszahl mit wenigsten 50% Mikrogliaabdeckung ergaben eine signifikant höhere mikrogliale Aktivierung in den APP/PS1-FVB Mäusen zu mittleren und späten Zeitpunkten verglichen mit den gleichaltrigen APP/PS1-B6 Tieren. Alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05 \pm$ SEM. (publiziert in ¹⁷¹)

Um eine potentielle Auswirkung der erhöhten mikroglialen Aktivierung in den APP/PS1-FVB Tieren auf die A β -Pathologie feststellen zu können, erfolgte die Analyse der amyloiden Ablagerungen beider transgener Mausstämmen mittels IHC. Dafür wurden, zu den definierten Zeitpunkten, Hirnschnitte von beiden Mausstämmen angefertigt und mit Hilfe eines A β -Antikörpers (Klon 6F3D) braun angefärbt (3.2.3). Wie erwartet konnten erste A β -Plaques im Neokortex in beiden APP/PS1 transgenen Mauslinien im Alter von 50 d detektiert werden. Mit steigendem Alter war eine zunehmende β -Amyloidosis in beiden Mausstämmen ersichtlich, wobei erstmals Plaques im Hippocampus und Hirnstamm zum Zeitpunkt von 100 d auftraten (Abb.: 13A). Während beim visuellen Vergleich keine auffälligen Unterschiede in der A β -Pathologie zwischen den transgenen Mausstämmen im frühen und mittleren Stadium der AD-Erkrankung erkennbar waren (Abb.: 13A), deuteten die qualitativen A β -Färbungen zu den späteren Zeitpunkten, insbesondere im Alter von 200 d, auf eine höhere A β -Belastung in den APP/PS1-B6 Mäusen verglichen mit den APP/PS1-FVB Tieren hin (Abb.: 13B).

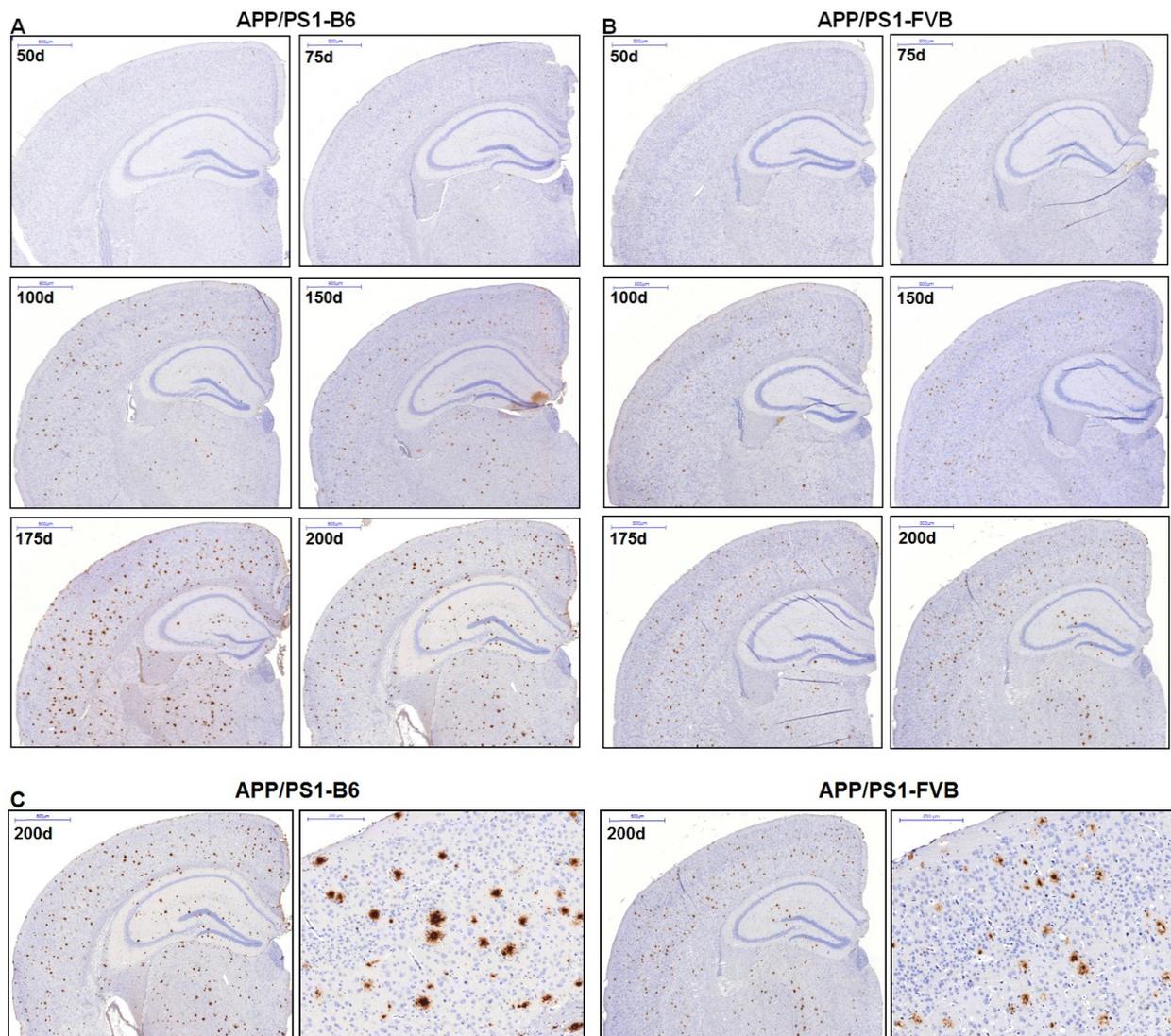


Abb. 13: Qualitative Darstellung der amyloiden Ablagerungen von APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB Mäusen im Alter von 50-200 d. A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen der A β -Plaques (braun) im gesamten Kortex von APP/PS1-B6 Tieren in einem Alter von 50, 75, 100, 150, 175 und 200 d. B) A β -gefärbte Kortexes der gleichaltrigen APP/PS1-FVB Mäuse (2-fache Vergrößerung). C) Qualitative Profile der A β -Plaques (braun) im Gehirn von 200d alten Tieren beider APP/PS1 transgener Mausstämmen. Die höhere Vergrößerung zeigt eine größere A β -Belastung im Kortex der B6 Mäuse verglichen mit den FVB Tieren.

Ähnlich wie bei der Charakterisierung der mikroglialen Aktivierung wurden im Anschluss die A β -Färbungen digitalisiert und mit Hilfe eines halb-automatischen Verfahrens, das in definierten Bereichen des Kortex die Plaqueanzahl, Plaquegröße sowie kortikale Plaquebedeckung berechnet, analysiert (3.2.4).

Die Quantifizierung der Plaqueanzahl in den beiden APP/PS1 transgenen Mausstämmen ergab im Untersuchungszeitraum von 50 bis 175 d keine signifikanten Differenzen. Sowohl die transgenen B6 als auch FVB Tiere zeigten über die Zeit eine stufenweise Zunahme der A β -Ablagerungen. Lediglich bei 200 d war die Anzahl der A β -Plaques in den FVB Mäusen

mit durchschnittlich 487 Plaques pro 10 mm² Kortexfläche signifikant niedriger als in den B6 Tieren (547 Plaques/10 mm² Kortexfläche) (Abb.: 14A). Bei der Berechnung des Flächenanteils, den die gesamten Plaques zusammengenommen im Kortexbereich einnehmen, wurden Mausstamm-spezifische Unterschiede zu den Zeitpunkten von 175 und 200 d festgestellt. Zwischen einem Alter von 50 d und 150 d zeigten beide APP/PS1 transgene Mausstämme einen leichten Anstieg in der Gesamtheit der Plaueflächen zur Kortexfläche. Zu diesen Zeitpunkten war der prozentuale Anteil der kortikalen Plauebedeckung in den APP/PS1-FVB und –B6 Tieren nahezu gleich. Während sich in der APP/PS1-FVB Mauslinie danach die Gesamtfläche der amyloiden Ablagerungen gegenüber der Kortexfläche weiterhin nur schwach erhöhte, war in den transgenen B6 Tieren eine starke Zunahme in der kortikalen Plauebedeckung ersichtlich. Dabei konnte beim Untersuchungszeitpunkt von 175 d eine ca. 2-fache Erhöhung des prozentualen Anteils der gesamten Plaueflächen zur Kortexfläche in den APP/PS1-B6 Mäusen gegenüber den transgenen FVB Tieren bestimmt werden, die auf das 2,5-fache im Alter von 200 d stieg (Abb.: 14B).

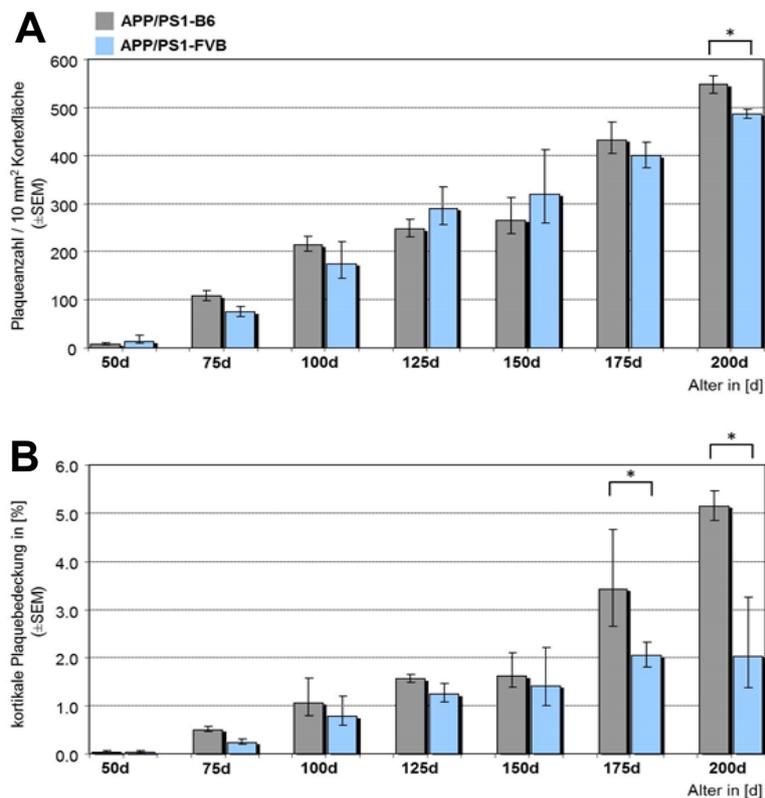


Abb. 14: Mausstamm-spezifische Unterschiede in der A β -Pathologie von APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB transgenen Tieren zu den späten Zeitpunkten. Zeitabhängige Analysen der A) Plaueanzahl ergaben im Alter von 200 d eine signifikant niedrige Plaueanzahl in den APP/PS1-FVB Tieren verglichen mit den gleichaltrigen APP/PS1-B6 Mäusen. Die Quantifizierung der B) kortikalen Plauebedeckung zeigte signifikante Unterschiede zwischen den APP/PS1-FVB und APP/PS1-B6 Mäusen zu den späten Zeitpunkten von 175 d sowie 200 d. Alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$. (publiziert in ¹⁷¹)

In nächsten Schritt sollte der ursächliche Grund für die Diskrepanz, der 61%-ige Abnahme der kortikalen Plaquebedeckung in den transgenen FVB Mäusen, bei einer nur 12%-igen Reduktion in der Plaqueanzahl verglichen mit den B6 Mäusen im Alter von 200d, untersucht werden. Da zum Zeitpunkt von 175 d der Flächenanteil der Plaques im Kortextbereich der APP/PS1-FVB Mäuse, trotz annähernd gleicher Plaqueanzahl wie in den transgenen B6 Tieren, signifikant vermindert war, kann für diese festgestellte Abweichung nur Unterschiede in den Plaquegrößen eine mögliche Erklärung sein. Aus diesem Grund wurden die A β -Plaques in drei separate Gruppen je nach ihrer Größe unterteilt: klein $\leq 400 \mu\text{m}^2$ < mittel < $700\mu\text{m}^2 \leq$ groß¹³⁸. In Abbildung 15A ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Plaquegrößengruppen beider transgenen Mausstämmen über die gesamte Untersuchungsperiode dargestellt. Der Anteil der mittleren Plaques erhöhte sich in beiden Mausmodellen dramatisch zwischen dem 50. und 75. d, blieb danach aber konstant mit ähnlichen Werten für die transgenen FVB und B6 Tiere. Die Verteilung kleiner und großer Plaques zeigte dagegen zeitabhängige Unterschiede zwischen den transgenen Mausstämmen. In beiden war im Verlauf der Analyse neben der Abnahme von kleinen Plaques ein Anstieg der großen Plaques feststellbar. Jedoch war in den APP/PS1-FVB Mäusen eine langsamere Verringerung des prozentualen Anteils an kleinen A β -Plaques sowie ein verminderter Anstieg der Fraktion von großen amyloiden Ablagerungen über den analysierten Zeitraum feststellbar. In den APP/PS1-FVB Mäusen lag der prozentuale Anteil der großen Plaques zu allen Zeitpunkten deutlich unter dem der kleinen Plaques. Im Gegensatz dazu war der prozentuale Anteil der großen Plaques in den APP/PS1-B6 Tieren so stark angestiegen, dass er ab dem 150. d über der Fraktion der kleinen Plaques lag (Abb.: 15A). Die stärksten Unterschiede in der Verteilung von kleinen und großen Plaques zeigten sich bei 175 und 200 Tagen. Im Alter von 175 d waren in den APP/PS1-FVB Tieren fast die Hälfte (49,2%) der Plaques kleiner als $400 \mu\text{m}^2$ und nur 20,7 % der Plaques größer als $700 \mu\text{m}^2$. In den APP/PS1-B6 Mäusen dagegen lag, zum gleichen Zeitpunkt, der prozentuale Anteil an kleinen Plaques bei 33,5% und der der großen bei 41,4% (Abb.: 15B). Bei 200 d gehörten in den transgenen FVB Mäusen noch 45,5% der Plaques der Gruppe der kleinen Ablagerungen an, während in den APP/PS1-B6 Tiere nur 35,2% zu den dieser Gruppe gezählt werden konnte. Im Gegensatz dazu war der Anteil an großen Plaques mit 27,8% in den APP/PS1-FVB Mäusen beträchtlich niedriger als im APP/PS1-B6 Mausmodell, die durchschnittlich 42,5% der Plaques mit einer Größe von über $700 \mu\text{m}^2$ aufwiesen (Abb.: 15C). Für die mittleren Plaques zeigte sich auch zum Zeitpunkt von 200 d ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden transgenen AD-Mausstämmen, der jedoch nicht so bedeutend ausfiel wie für die kleinen bzw. großen Ablagerungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte mikrogliale Assoziation um die A β -Plaques in den APP/PS1-FVB Tieren mit einer stärkeren Beschränkung im Wachstum ihrer amyloiden Ablagerungen, verglichen mit den APP/PS1-B6 Mäusen, einhergeht. Die Daten lassen auf eine Verbindung zwischen unterschiedlicher

Mikrogliaaktivierung und veränderter A β -Pathologie in beiden APP/PS1 Mauslinien schließen und deuten daraufhin, dass eine erhöhte Reaktivität der Mikroglia zu einer Verringerung der A β -Belastung im Verlauf der AD führt.

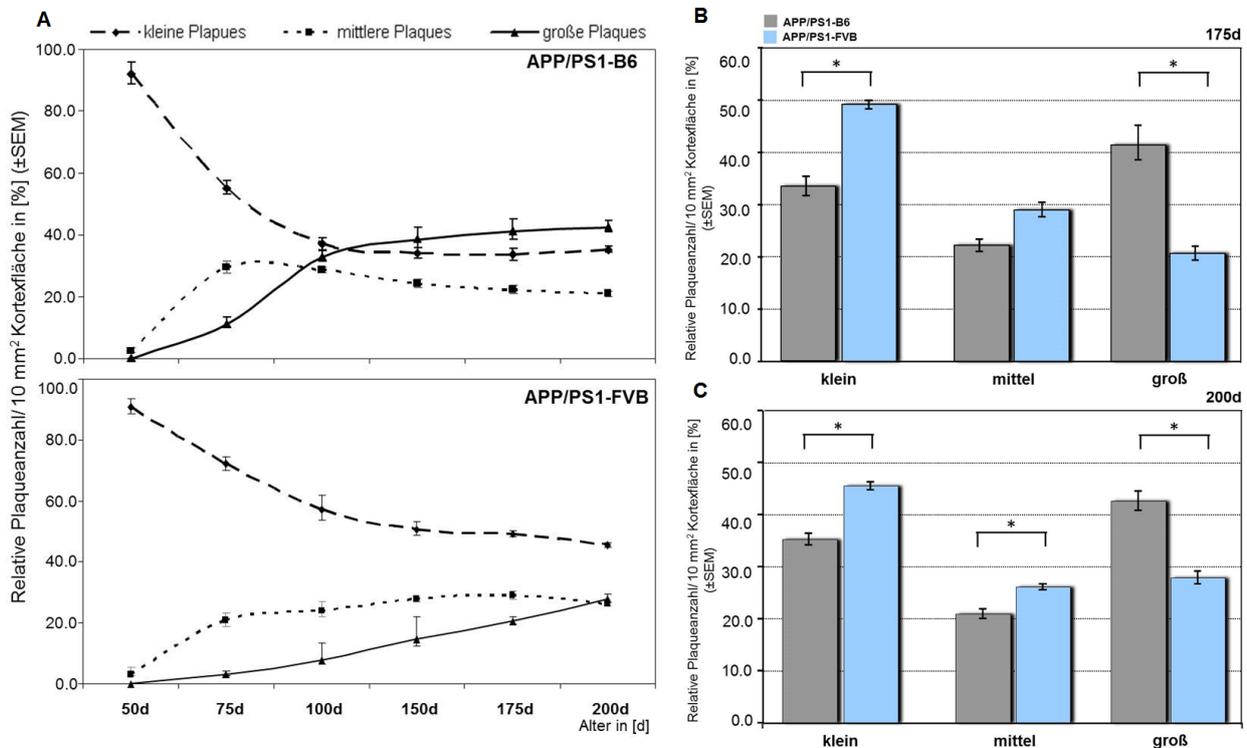


Abb. 15: Mausstamm-spezifische Unterschiede in der Plaquegrößenverteilung von APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB transgenen Tieren. A) Die Quantifizierung von kleinen ($\leq 400 \mu\text{m}^2$, gestrichelte Linie), mittleren (gepunktete Linie) und großen ($\geq 700 \mu\text{m}^2$, durchgezogene Linie) in APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB Mäusen in einem Alter von 50 d bis 200 d. B,C) Die Verteilung an kleinen und großen Plaques zeigte bedeutende Unterschiede zwischen beiden transgenen Mausmodellen zu den Zeitpunkten von 175 d und 200 d. Alle Messungen wurden auf 10 mm^2 kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$. (publiziert in ¹⁷¹)

Um weitere mögliche Auswirkungen, der unterschiedlichen Mikrogliaaktivität auf die A β -Pathologie zu prüfen, wurden im Verlauf der Untersuchung die zerebralen A β_{42} -Konzentrationen von APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB Tieren in einem Zeitintervall von 25 d zwischen einem Alter von 50 bis 200 d gemessen. Dazu erfolgte mittels ELISA in Hirnhomogenaten von beiden transgenen Mausmodellen separate Messungen der Konzentrationen von A β_{42} -Monomeren / Oligomeren als auch von A β_{42} -Protofibrillen / Fibrillen (3.2.6).

Der Gehalt an $A\beta_{42}$ -Monomeren /Oligomeren erhöhte sich in beiden AD-Mauslinien gleichermaßen kontinuierlich bis zum Zeitpunkt von 150 d. Jedoch mit zunehmendem Alter stieg die Menge an $A\beta_{42}$ in Form von Monomeren und Oligomeren in den APP/PS1-B6 Tieren weiter an, wobei sie in den Mäusen mit FVB-Hintergrund nahezu konstant blieb. Im Vergleich zu den transgenen B6 Tieren war die Gesamtkonzentration von $A\beta_{42}$ -Monomeren / Oligomeren um 42% bzw. 52% niedriger zu den Zeitpunkten von 175 und 200 d (Abb.: 16A). Bei der Bestimmung der Konzentration von $A\beta_{42}$ -Protofibrillen / Fibrillen war ein ähnliches Ergebnis feststellbar. Beide transgenen Mausstämme zeigten einen gleichen Anstieg des Gehaltes an Protofibrillen und Fibrillen bis zum Alter von 150 d. Danach ergaben die Messungen wiederum Mausstamm-spezifische Unterschiede. Im Gegensatz zu den relativ gleichbleibenden Konzentrationen an aggregierten $A\beta_{42}$ in den APP/PS1-FVB Mäusen zu den späten Zeitpunkten, erhöhte sich der Gehalt an $A\beta_{42}$ -Protofibrillen / Fibrillen in den Tieren mit den B6-Allelen kontinuierlich auf ein Maximum von 1344,2 ng/mg Gehirnextrakt bei 200 d. Dies einer signifikanten Erhöhung von 120% gegenüber den gleichaltrigen APP/PS1-FVB Mäusen entspricht (Abb.: 16B).

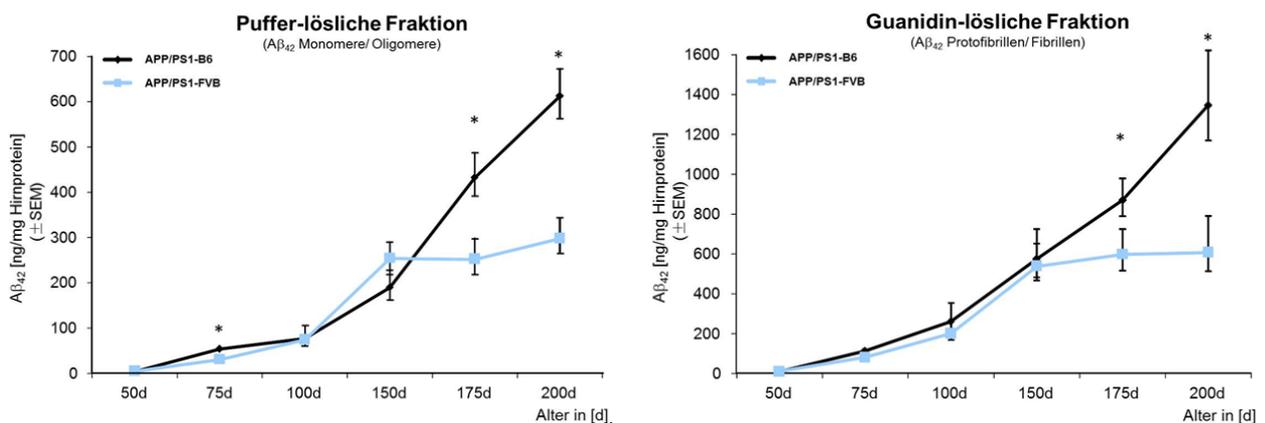


Abb. 16: Mausstamm-spezifische Unterschiede in den zerebralen $A\beta_{42}$ -Konzentration von APP/PS1-B6 und APP/PS1-FVB transgenen Tieren zu den späten Zeitpunkten. Zeitabhängige Analysen der Konzentrationen an A) $A\beta_{42}$ -Monomere / Oligomere (Puffer-lösliche Fraktion) und B) $A\beta_{42}$ -Protofibrillen / Fibrillen (Guanidin-lösliche Fraktion) ergaben signifikant niedrige zerebrale Gesamt $A\beta$ -Mengen in den APP/PS1-FVB Mäusen zu den Zeitpunkten von 175 d und 200 d verglichen mit gleichaltrigen Tieren des APP/PS1-B6 Mausmodells. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$. (publiziert in ¹⁷¹)

4.3 Einfluss von somatisch mitochondrialen DNA-Modifikationen auf die mikrogliale Aktivierung im Verlauf bei der AD

Die nachgewiesene Assoziation von mitochondrialer Dysfunktion bei verminderter Energieproduktion und erhöhter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen altersbedingter neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz sowie die Tatsache, dass die zur Aktivierung von Mikroglia notwendige Signalkaskade vom extrazellulären und intrazellulären Energiehaushalt abhängig ist, lassen eine Verbindung zwischen Mitochondrienfunktion und Mikrogliaaktivierung während der AD-Pathogenese vermuten^{103,172}. Da bis dato über den Zusammenhang zwischen mikroglialer Antwort und krankheitsbedingten Dysfunktionen der Mitochondrien, hervorgerufen durch Mutationen im mitochondrialen Genom, noch wenig bekannt ist, ist es notwendig die Relevanz von spezifischen mitochondrialen DNA- (mtDNA) Modifikationen auf die Aktivierung der Mikroglia bei der AD zu analysieren.

Zu diesem Zweck erfolgte in unserem Labor die Generierung eines neuen AD-Mausmodells, welches spezifische Veränderungen in der mtDNA aller somatischen Zellen besitzt. Dazu wurden männliche Tiere des B6 Mausstamm mit weiblichen Tieren des NOD/LtJ Inzuchtstammes, der natürlich vorkommende mtDNA Variationen gegenüber der B6 Mauslinie aufweist, über mehrere Generationen zurückgekreuzt (ca. 5 Jahre). Dadurch wurden die mitochondrialen Modifikationen des NOD/LtJ Mausstammes in einen rein nukleären genetischen B6 Hintergrund überführt. Die Veränderungen im Genom der Mitochondrien betreffen dabei zwei Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, die NADH-Dehydrogenase und die Cytochrom C Oxidase sowie die tRNA für Arginin¹⁶⁵. Weibliche Tiere der resultierenden konplastischen Mauslinie (B6xmtNOD/LtJ) wurden dann mit männlichen APP/PS1-B6 Tieren gekreuzt, um Mäuse (APP/PS1-B6xmtNOD) mit zerebraler β -Amyloidose und den spezifischen mitochondrialen DNA-Modifikationen zu erzeugen (3.1.8). Mit der Generierung von APP/PS1-B6xmtNOD Tieren konnte anschließend exklusiv der Effekt der spezifischen mitochondrialen DNA-Veränderungen auf die $A\beta$ -vermittelte Mikrogliaaktivierung analysiert werden, ohne den gezeigten Einfluss der genetischen Konstitution hinsichtlich der mikroglialen Reaktion im Verlauf der AD zu berücksichtigen. Dazu wurden von den APP/PS1-B6 und APP/PS1-B6xmtNOD Mauslinien mindestens jeweils 6 Tieren geschlechtsunabhängig in einem Alter von 200 d, im Hinblick auf den zerebralen ATP-Gehalt sowie der mikroglialen Aktivierung in Verbindung mit der $A\beta$ -Pathologie, vergleichend untersucht.

Mittels eines Luziferin / Luziferase ATP-Biolumineszents Test Kits erfolgte an frisch präparierten Gehirnhomogenaten beider Mauslinien die Bestimmung der zerebralen ATP-Konzentration (3.2.2, 3.2.7). Die mtDNA-Modifikationen im generierten konplastischen Mausmodell zeigten dabei einen nachweisbaren Effekt auf die mitochondriale

Energieproduktion. So war bei 200 d der ATP-Gehalt in den APP/PS1-B6mtNOD Mäusen um circa 75% erhöht im Vergleich zu den gleichaltrigen APP/PS1-B6 Kontrolltieren (Abb.: 17).

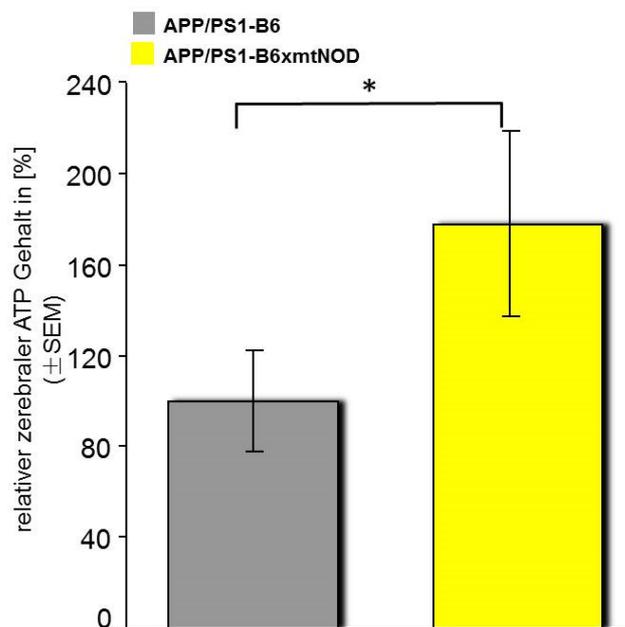


Abb. 17: Spezifische Unterschiede in der zerebralen ATP-Konzentration in den APP/PS1-B6 und APP/PS1-B6xmtNOD transgenen Tieren zum Zeitpunkt von 200 d. Die Bestimmung der ATP-Konzentration ergab eine signifikante Erhöhung im zerebralen ATP-Gehalt bei den mit spezifischen Veränderungen im mitochondrialen Genom ausgestatteten APP/PS1-B6xmtNOD Mäusen verglichen mit den APP/PS1-B6 Tieren im Alter von 200 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$. (publiziert in ¹⁷³)

Zur Aufdeckung, ob die durch die spezifischen mtDNA-Veränderungen aufgezeigte größere ATP-Produktion im APP/PS1-B6xmtNOD Mausmodell einen Einfluss auf die mikrogliale Reaktion im Verlauf der AD-Pathogenese besitzt, wurden im nächsten Schritt die Mikroglia und A β -Plaques auf Hirnschnitten von 200 d alten Tieren beider Mauslinien immunhistochemisch angefärbt. Anschließend dienten die angefertigten Doppelfärbung mittels beschriebenen semi-automatisierten Verfahrens zur quantitativen Analyse der temporären und spatialen mikroglialen Aktivierung um und in den amyloiden Ablagerungen. Der visuelle Vergleich der Doppelfärbung weist auf eine wesentlich höhere Mikrogliose in Assoziation mit der zerebralen β -Amyloidose in den APP/PS1-B6xmtNOD Tieren gegenüber den APP/PS1-B6 Mäusen hin (Abb.: 18A). Dies wird durch die Quantifizierung der relativen Plaqueanzahl, bei der wenigstens 50% der Plaquefläche mit Mikroglia bedeckt sind, als empirisch definierter Marker der mikroglialen Aktivität, bestätigt. Beim Untersuchungszeitpunkt von 200 d wiesen im konplastischen APP/PS1-B6mtNOD Mausmodell circa 91% der gesamten Plaques eine mikrogliale Bedeckung von über 50% aus. Im Vergleich dazu waren in den

APP/PS1-B6 Tieren nur rund 47% der Gesamtplaques mit über der Hälfte ihrer Fläche mit Mikroglia bedeckt. Damit konnte eine 93%-ige Zunahme in der Anzahl der A β -Ablagerungen mit wenigsten 50% mikroglialer Bedeckung in den APP/PS1-B6mtNOD Mäusen verglichen mit den Kontrolltieren (APP/PS1-B6) bei 200 d festgestellt werden (Abb.: 18B).

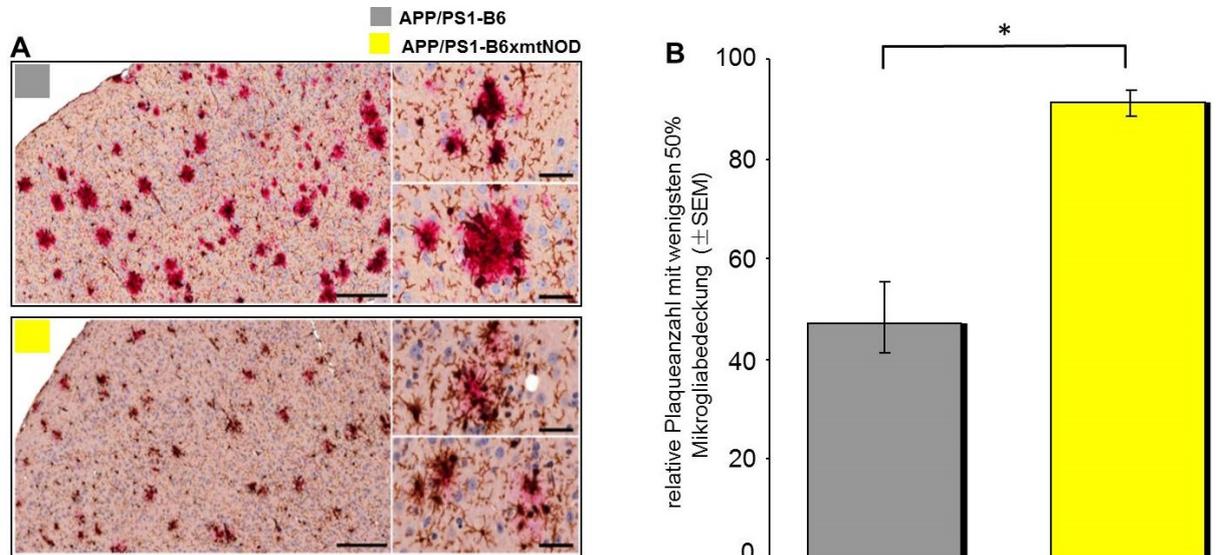


Abb. 18: Spezifische Unterschiede in der A β -vermittelten mikroglialen Aktivierung in den APP/PS1-B6 und APP/PS1-B6xmtNOD transgenen Tieren zum Zeitpunkt von 200 d. A) Repräsentative immunhistochemische Doppelfärbungen von Mikroglia (braun) und Plaques (rot) im APP/PS1-B6xmtNOD Mausmodell, das die mitochondrialen DNA-Veränderungen besitzt, deuten auf eine erhöhte mikrogliale Aktivierung bei 200 d hin .B) Die Quantifizierung der relativen Plaqueanzahl mit wenigstens 50% Mikrogliaabdeckung ergab eine signifikant höhere mikrogliale Aktivierung in den mitochondrial konplastischen APP/PS1-B6xmtNOD Mäusen zum Zeitpunkten von 200 d im Vergleich zu gleichaltrigen APP/PS1-B6 Kontrolltieren. Alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * p < 0.05. (publiziert in ¹⁷³)

Um die Auswirkung der erhöhten mikroglialen Aktivierung auf die zerebrale β -Amyloidose zu überprüfen, wurde die Anzahl der A β -Ablagerungen im mitochondrial konplastischen APP/PS1-B6xmtNOD Mausmodell im Vergleich zu APP/PS1-B6 Kontrolltieren ermittelt. Die Analyse erfolgte mittels immunhistochemischer Anfärbung der A β -Plaques auf Hirnschnitten zum Zeitpunkt von 200 d. Nach Digitalisierung der A β -Färbungen wurde mit Hilfe des halb-automatischen Verfahrens die Plaqueanzahlen in definierten Kortextbereichen bestimmt (3.2.4). Bereits die qualitativen immunhistochemischen Färbungen offenbarten dabei eine deutliche Reduzierung der charakteristischen A β -Plaques in den APP/PS1-B6xmtNOD Mäusen gegenüber den gleichaltrigen APP/PS1-B6 Tieren (Abb.: 19A). Die Quantifizierung ergab, dass die Anzahl der A β -Plaques in diesen Mäusen mit durchschnittlich 299 Plaques pro 10 mm² Kortextfläche signifikant niedriger als in den Kontrolltieren (552 Plaques/10 mm² Kortextfläche) war (Abb. 19B). Dies stellte einen Rückgang von 54% in der Plaqueanzahl dar.

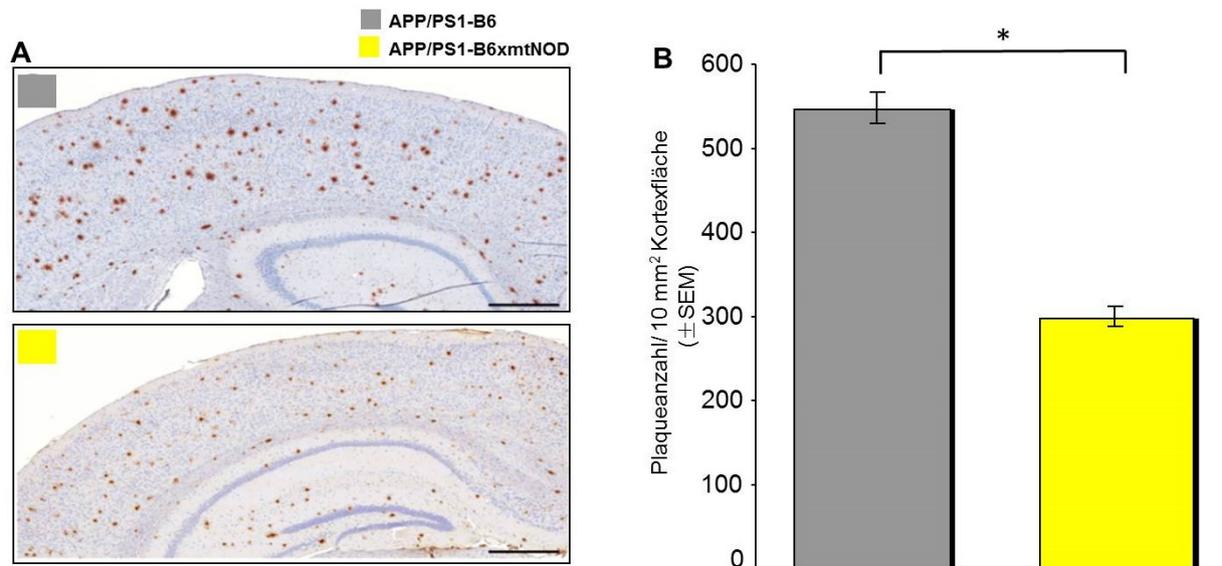


Abb. 19: Spezifische Unterschiede in der Anzahl der A β -Plaques in den APP/PS1-B6 und APP/PS1-B6xmtNOD transgenen Tieren zum Zeitpunkt von 200 d. A) Repräsentative immunhistochemische Färbungen von A β -Plaques (braun) zeigen im mit mitochondrialen DNA-Modifikationen ausgestatteten APP/PS1-B6xmtNOD Mausmodell eine deutliche Reduzierung der Plaqueanzahl verglichen mit den APP/PS1-B6 Kontrollmäusen bei 200 d. B) Die Quantifizierung ergab eine signifikant niedrige Plaqueanzahl in den mitochondrial konplastischen APP/PS1-B6xmtNOD Mäusen gegenüber den APP/PS1-B6 Kontrolltieren. Alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$. (publiziert in ¹⁷³)

Zur Klärung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen mitochondrialen Polymorphismus und reduzierter Anzahl der A β -Plaques in den APP/PS1-B6xmtNOD Tieren wurden im folgenden Schritt die A β -Phagozytosefähigkeit der Mikroglia beider sich im mitochondrialen Genom unterscheidenden Mausstämmen *in vitro* untersucht. Dazu erfolgte, mit leichten Abänderungen des Protokolls von Horvath *et al.*, die Gewinnung von primären Mikroglia aus zwei bis drei Tage alten Tieren des B6mtxNOD sowie des B6 Mausmodells ¹⁶⁷. Auf Grundlage der Messung ihrer Aufnahme von FITC-markierten A β_{42} mittels Immunfluoreszenz, dienten die isolierten Mikroglia anschließend zur Quantifizierung der A β -Phagozytosefähigkeit (3.2.8, 3.2.9).

Zum einen zeigten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von denen mit FITC-markierten synthetischen A β_{42} -inkubierten Mikroglia beider Mausstämmen unter Verwendung des Mikroglia-spezifischen IBA1-Antikörpers eine intravesikuläre Lokalisation der A β -Anreicherungen (Abb.: 20A). Die Quantifizierung dagegen ergab eine um 28% erhöhte A β -Phagozytoseaktivität der Mikroglia aus den B6xmtNOD Mäusen im Vergleich zu den isolierten Mikroglia aus den B6 Kontrolltieren (Abb.: 20B).

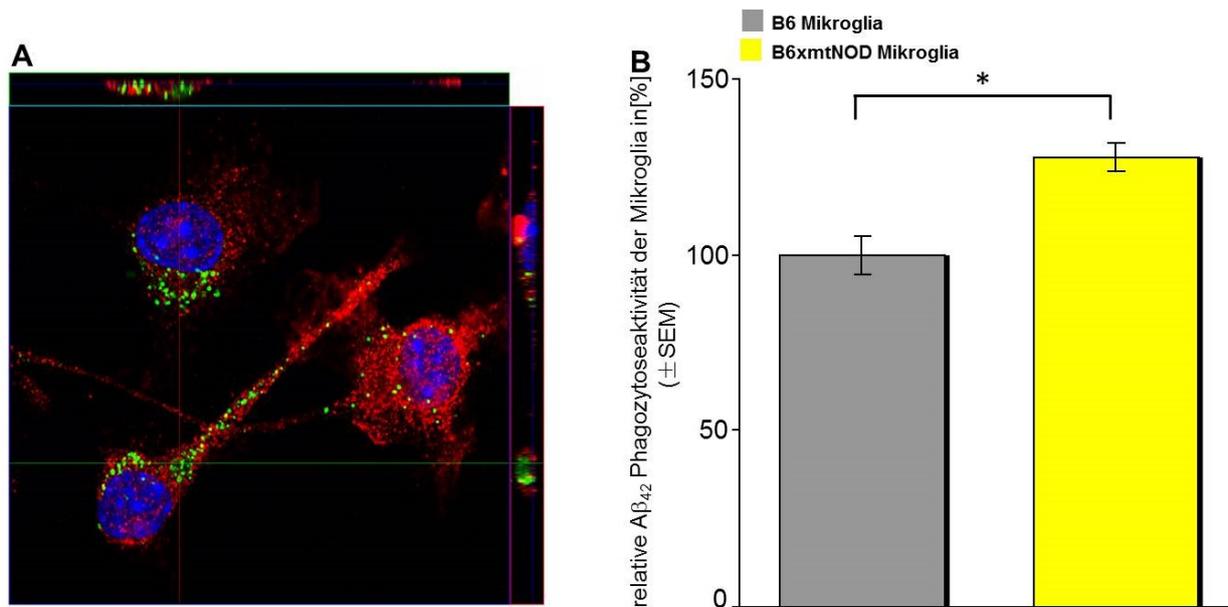


Abb. 20: Spezifische Unterschiede in der Aβ-Phagozytosefähigkeit von isolierten Mikroglia aus B6 und B6xmtNOD Tieren. A) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von IBA1 positiven Mikroglia (rot) demonstrieren die Phagozytose des FITC-markierten Aβ₄₂ (grün). DAPI-angefärbte Zellkerne (blau). B) Die Quantifizierung der *in vitro* Aβ₄₂-Phagozytosefähigkeit zeigte eine signifikant höhere Aufnahme an synthetischen Aβ₄₂ in den B6xmtNOD Mäusen gegenüber den B6 Kontrolltieren. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten (n≥5). *p< 0.05. (publiziert in ¹⁷³)

4.4 Einfluss von mitochondrialen DNA-Modifikationen in den Mikroglia auf deren Aktivierung im Verlauf bei der AD

4.4.1 Generierung des APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mausmodells

Die erhöhte Aβ₄₂-Phagozytoseaktivität der B6xmtNOD Mikroglia zeigt eine eindeutige Verbindung zwischen funktionellen mikroglialen Phänotyp und den spezifischen DNA-Veränderungen in ihren Mitochondrien. Um im Folgenden die exakten Auswirkungen der mtNOD-Modifikation auf die Aktivierung bzw. Funktion der Mikroglia im Zusammenhang mit der Aβ-Pathologie in einem AD-Mausmodell der zerebralen β-Amyloidose zu untersuchen, war es notwendig, APP/PS1-B6 transgene Mäuse zu erzeugen, bei denen die spezifischen Veränderungen im mitochondrialen Genom nur auf die Mikroglia beschränkt sind. Zu diesem Zweck wurden zunächst weibliche B6xmtNOD Mäuse mit männlichen Cx3CR1/eGFP-B6 Tieren (3.1.8.), dessen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs, engl. hematopoietic stem cells) das als Reporter gen dienende grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren, verpaart. Die Nachkommen der Verpaarung (Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD, 3.1.8) enthalten somit GFP-markierte hämatopoetische Stammzellen mit den spezifischen mitochondrialen Veränderungen. Da im adulten Gehirn die Mikroglia zum Teil aus eingewanderten

Blutmonozyten hervorgehen, die im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden, erfolgte im nächsten Schritt die Generierung von Knochenmarkchimären Mäusen. Dazu erhielten APP/PS1-B6 Empfängertiere in einem Alter von 45 Tagen in einem Abstand von 4 h eine zweimalige Ganzkörperbestrahlung mit 9 Gy, unter der Verwendung einer ^{137}Cs -Quelle, um Läsionen in ihrem Knochenmark (KM) zu bilden. 24 h später wurden den bestrahlten APP/PS1-B6 Tieren jeweils 6×10^6 isolierte Knochenmarkzellen (3.2.10.) aus sechs bis acht Wochen alten Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD Mäusen über die Schwanzvenen injiziert (Abb.: 21).

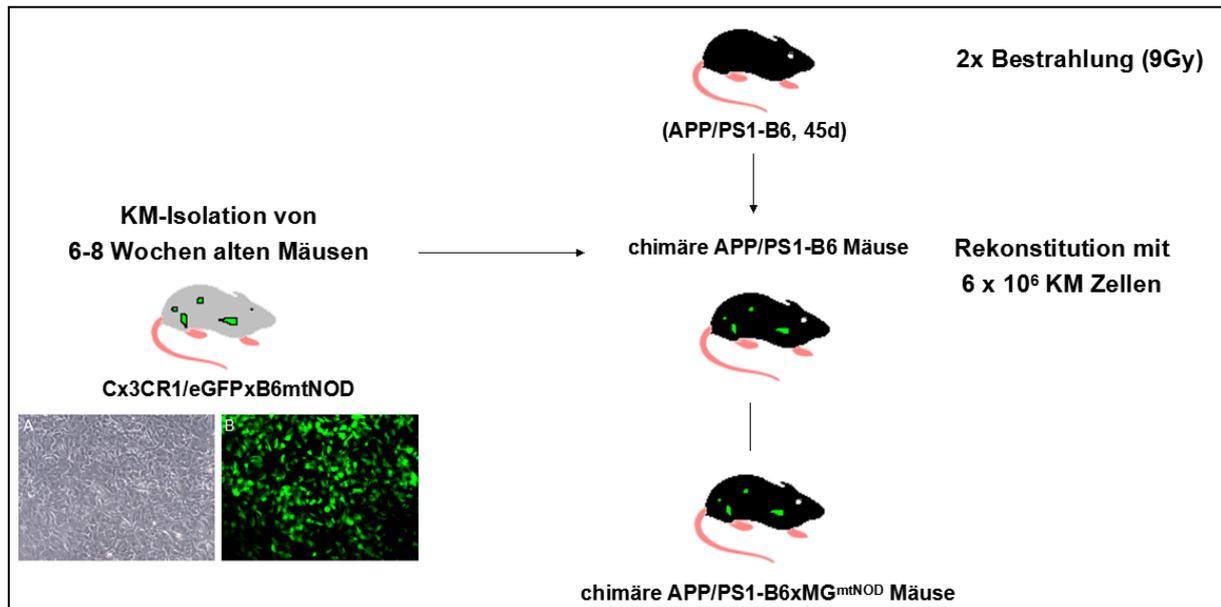


Abb. 21: Schema für die Generierung von Knochenmarkchimären APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Tieren, die die mitochondrialen DNA-Variationen der NOD/LtJ Mauslinie ausschließlich in ihren Mikroglia besitzen. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen A) eine Hellfelddarstellung der isolierten Knochenmarkzellen aus Cx3CR1/eGFP-B6xmtNOD Mäusen und B) eine Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme derselben Knochenmarkzellen mit grün fluoreszierenden hämatopoetische Stammzellen (10-fache Vergrößerung).

In den darauffolgenden Wochen wächst das Spenderknochenmark in den erzeugten Nischen des Knochenmarks der APP/PS1-B6 Empfängertiere an und übernimmt blutbildende Funktionen. Aus den mit spezifischen mitochondrialen Veränderungen ausgestatteten, GFP-markierten hämatopoetischen Stammzellen entstehen Blutmonozyten, die nun dieselben mitochondrialen Modifikationen wie B6xmtNOD Mäuse besitzen. Diese Blutmonozyten können in die unterschiedlichsten Organe einwandern, wo sie zu Gewebemakrophagen differenzieren, inklusive zu Mikroglia im zentralen Nervensystem. Zur Kontrolle der Funktionalität der Knochenmarkstransplantation und dem damit verbundenen Nachweis der Generierung von APP/PS1-B6 transgenen Tieren, die die spezifische mitochondrialen DNA

Modifikationen des NOD/LtJ Mausstammes ausschließlich in ihren Mikroglia besitzen, wurden die erzeugten Knochenmarkchimären Tiere in einem Alter von 100 d untersucht. Dabei konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz in der Leber sowie in der Milz zahlreiche grün-fluoreszierende Makrophagen, die aus den GFP-markierten hämatopoetischen Stammzellen des transplantierten Knochenmarks entstanden sind, im Gewebe beider Organe lokalisiert werden (Abb.: 22). Durch den Nachweis der grün-fluoreszierenden Gewebemakrophagen in Leber und Milz konnte von einer erfolgreichen Transplantation des Knochenmarks ausgegangen werden.

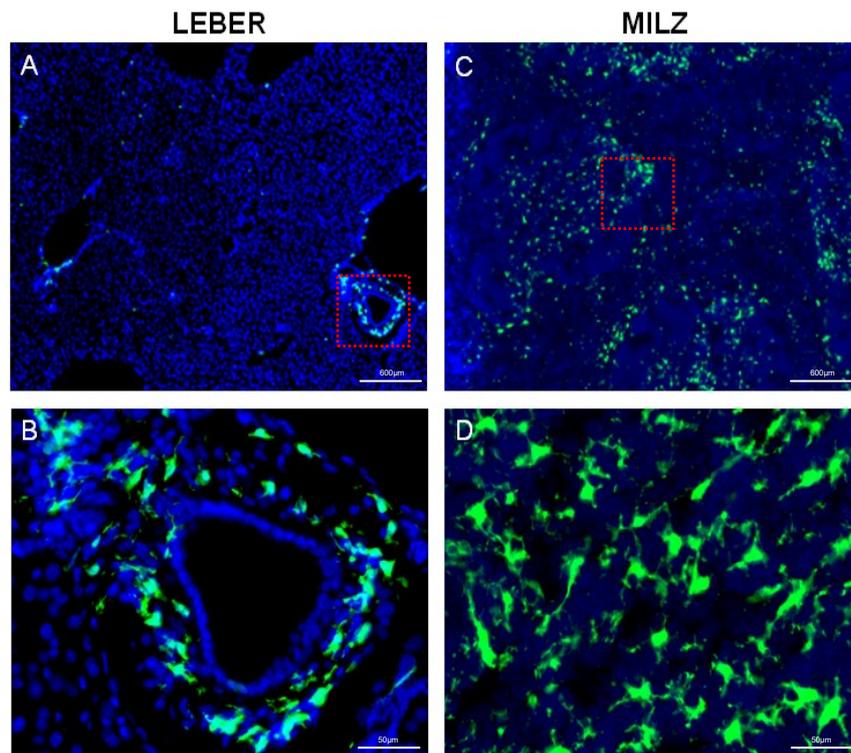


Abb. 22: Repräsentative Darstellung von Leber und Milz der generierten Knochenmarkchimären APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Tiere. A) Fluoreszenzmikroskopische Überblicksaufnahme der Leber in 2x Vergrößerung, B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des rot-markierten Ausschnittes in A: Lebergewebe mit grün fluoreszierenden Makrophagen (25fache Vergrößerung). C) Fluoreszenzmikroskopische Überblicksaufnahme der Milz in 2x Vergrößerung, D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Ausschnittes in C: Milzgewebe mit grün-fluoreszierenden Makrophagen (25fache Vergrößerung).

Des Weiteren konnten in den Gehirnen der untersuchten Knochenmarkchimären Mäuse eingewanderte GFP-positive Zellen, die ihren Ursprung im transplantierten Knochenmark besitzen, mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. In allen Bereichen des Gehirns wurden grün-fluoreszierenden Zellen, die Form und Größe den Mikroglia ähneln, identifiziert (Abb.: 23).

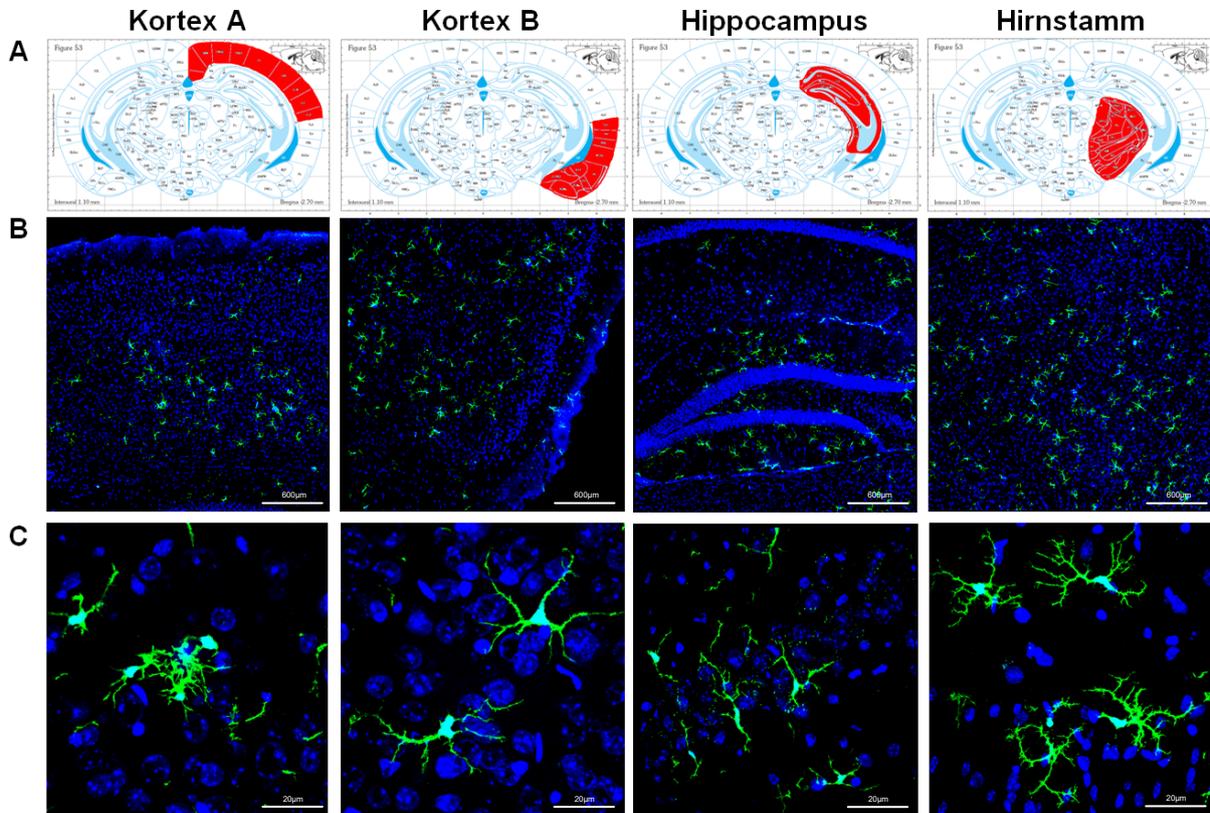


Abb. 23: Repräsentative Darstellung der GFP-markierten Zellen im Gehirn von Knochenmarkchimären APP/PS1-B6xMg^{mtNOD} Mäuse mittels Immunfluoreszenz. A) Schematische Darstellung der untersuchten Gehirnbereiche (rot). B) Fluoreszenzmikroskopische Überblicksaufnahme der untersuchten Bereiche mit grün-fluoreszierenden Zellen (2xfache Vergrößerung). C) 63xfache Vergrößerung der in B gezeigten Hirnareale mit grün-fluoreszierenden Zellen, die in ihrer Morphologie den Mikroglia gleichen.

Zum Nachweis, dass es sich bei diesen Zellen um Mikroglia handelt, die aus den GFP-markierten hämatopoetischen Stammzellen des transplantierten Knochenmarks hervorgingen, wurde eine Gegenfärbung der untersuchten Gehirne mit einem Mikroglia-spezifischen Antikörper (IBA1) durchgeführt. Durch die Visualisierung der Mikroglia in rot, erschienen die im transplantierten Knochenmark gebildeten und über das Blutsystem ins Gehirn der APP/PS1-B6 Empfängertiere eingewanderten Mikroglia im überlagerten Bild in gelb (Abb.: 24).

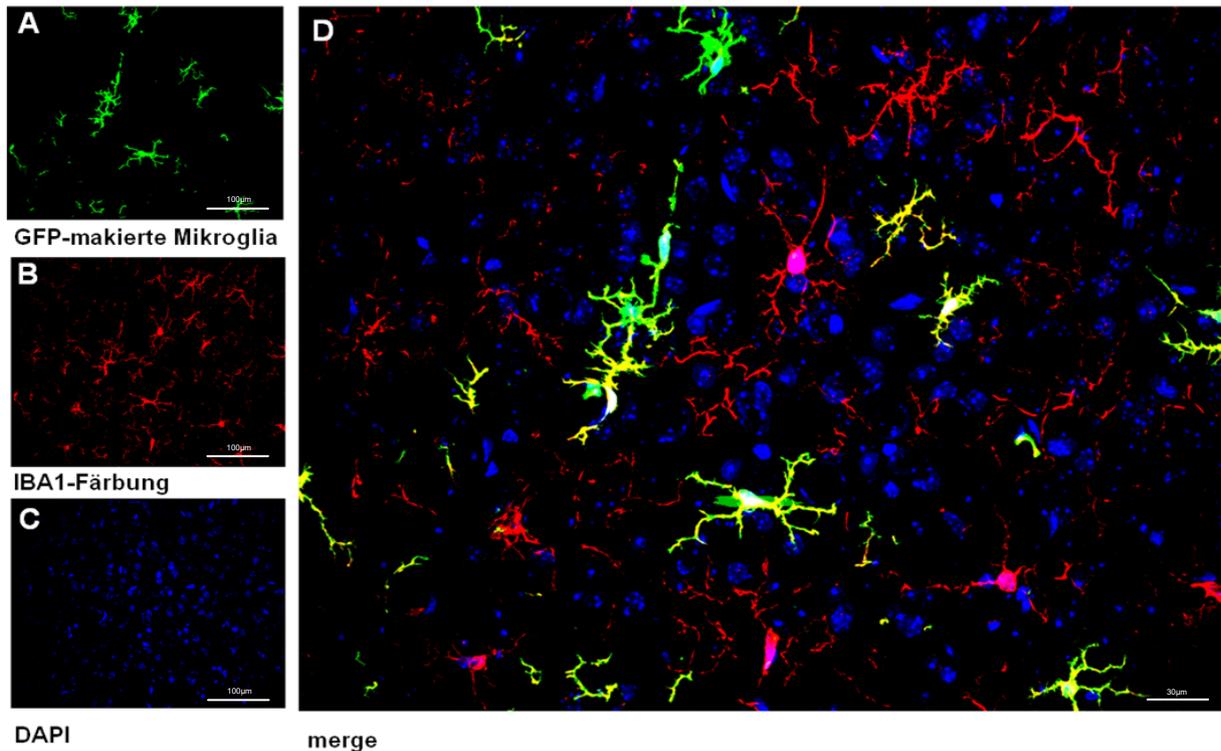


Abb. 24: Repräsentative Darstellung der Mikroglia im Gehirn der generierten Knochenmarkchimären $APP/PS1-B6xMG^{mtNOD}$ Mäuse. A) GFP-exprimierende Mikroglia in grün, B) IBA1-angefärbte Mikroglia in rot, C) DAPI-angefärbte Zellkerne in blau (12,5 Vergrößerung), D) Überlagerung von A, B und C, vom transplantierten Knochenmark-abstammende Mikroglia in gelb (40fache Vergrößerung).

Die Quantifizierung der IBA1-Färbung durch Auszählung der grün-fluoreszierenden Mikroglia im Vergleich zu allen rot gefärbten Mikroglia ergab, dass ungefähr 35% der gesamten Mikroglia in den Gehirnen der knochenmarkschimären Mäusen, die mtNOD-Modifikationen besaßen. Dazu wurden fünf zufällig ausgesuchte Felder in jeweils drei separaten Immunfluoreszenzfärbungen in insgesamt 10 Tieren quantifiziert. Darüber hinaus konnten zahlreiche dieser mitochondrial-modifizierte Mikroglia in der unmittelbarer Nähe zu A β -Ablagerungen nachgewiesen werden. Dazu wurden die A β -Plaques mit Hilfe eines A β -spezifischen Antikörpers (6E10) rot angefarbt (Abb.: 25).

Durch die Identifizierung GFP-exprimierender Mikroglia im Gehirn der $APP/PS1-B6xMG^{mtNOD}$ Knochenmarkchimären Tiere, konnte von einer erstmalig erfolgreichen Erzeugung eines AD-Mausmodells mit spezifischen mtDNA Veränderungen, die sie ausschließlich in ihren Mikroglia besitzen, ausgegangen werden.

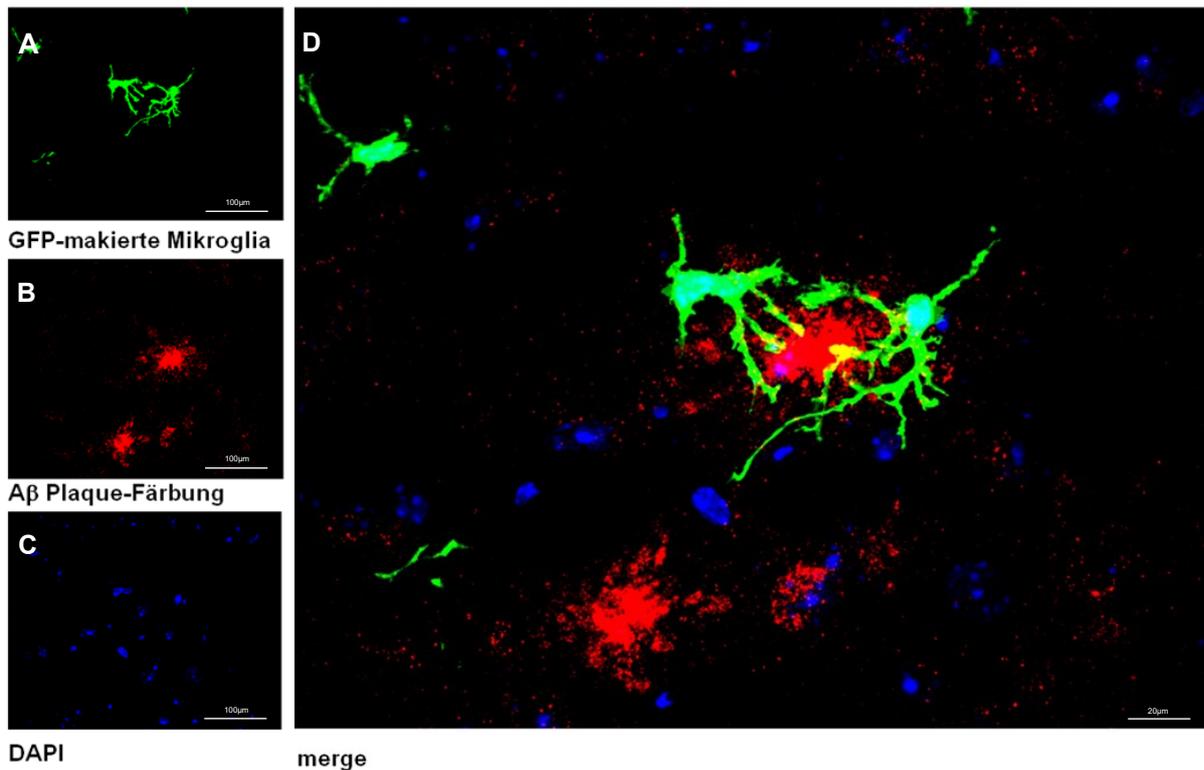


Abb. 25: Repräsentative Darstellung der räumlichen Nähe von eingewanderten mtNOD Mikroglia mit Aβ-Plaques im Gehirn der Knochenmarkchimäre APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mäuse. A) GFP-exprimierende Mikroglia in grün, B) 6E10-angefärbte Aβ-Plaques in rot, C) DAPI-angefärbte Zellkerne in blau (12,5 Vergrößerung), D) Überlagerung von A, B und C zur Darstellung der vom transplantierten Knochenmark-abstammenden Mikroglia in Assoziation mit einem Aβ-Plaques (63fache Vergrößerung).

4.4.2 Charakterisierung des APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mausmodells

Um Erkenntnisse über eine möglichen Auswirkung von krankheitsbedingt hervorgerufenen Mutationen im mitochondrialen Genom der Mikroglia auf ihre Reaktivität bzw. Funktion im Verlauf der AD zu gewinnen, erfolgte anschließend die Untersuchung der generierten APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mäuse in einem Alter von 100 d. Dazu wurde eine detaillierte Charakterisierung des Einflusses der mitochondrialen DNA-Modifikationen auf die mikrogliale Aktivierung vorgenommen. Dabei dienten chimäre APP/PS1-B6 Mäuse, die durch die Transplantation von Knochenmark aus Cx3CR1/eGFP-B6 Tieren erzeugt wurden, als Kontrolle. Die hämatopoetischen Stammzellen dieser generierten APP/PS1-B6xMG^{mtB6} Mäuse exprimierten das GFP als Reportergen, besitzen jedoch keine spezifischen Veränderungen im mitochondrialen Genom wie die APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mäuse.

Für die Charakterisierung wurden jeweils 10 generierte Tiere beider Knochenmarkchimären AD-Mauslinien hinsichtlich ihrer mikroglialen Aktivierung und Aβ-Pathologie in einem Alter von 100 d mit den umfassenden Methoden untersucht. Dabei ergab die Analyse der

mikroglialen Aktivierung zwischen den beiden chimären AD-Mauslinien keinen signifikanten Unterschied. Die durchschnittliche mikrogliale Fläche pro amyloider Ablagerung war bei den APP/PS1-B6xMG^{mtB6} Tieren mit 110 μm^2 annähernd gleich groß wie bei den APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} mit 127 μm^2 (Abb.: 26A). Auch die relative Anzahl der Plaques, bei denen wenigstens 50% ihrer Fläche mit Mikroglia bedeckt waren, zeigte mit 9% in den Mäusen ohne spezifische mikrogliale mtDNA-Veränderungen gegenüber 13% in den APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} ähnliche Werte (Abb.: 26B).

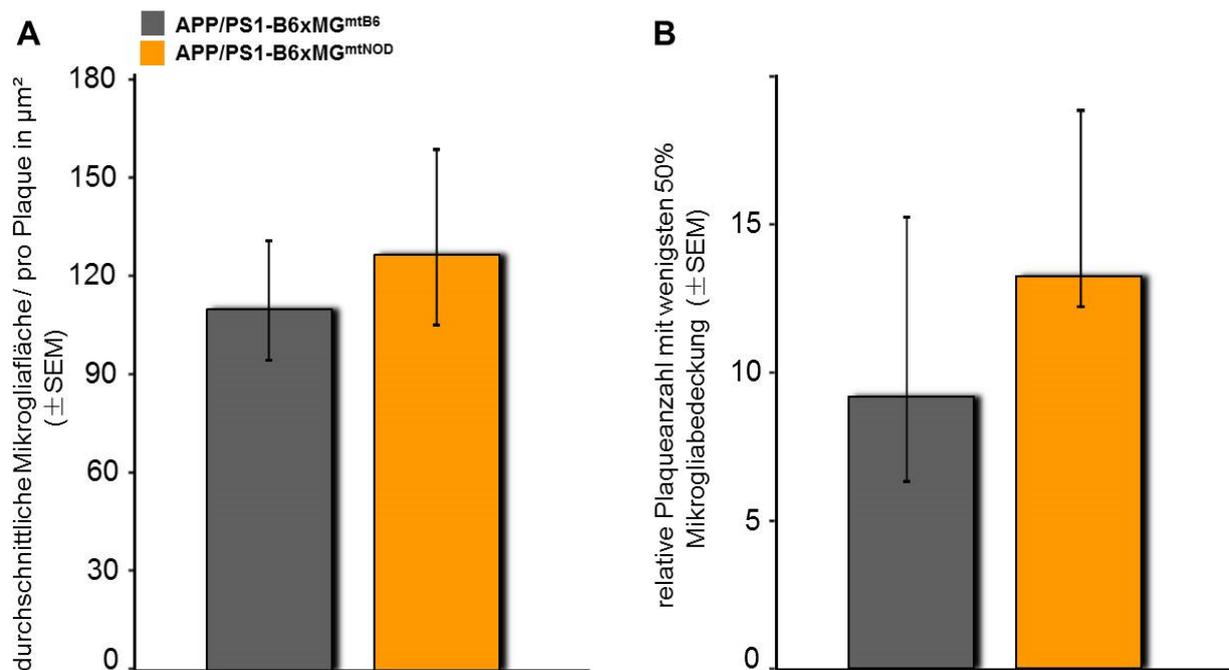


Abb. 26: Unveränderte mikrogliale Reaktivität zu den amyloiden Ablagerungen in den APP/PS1-B6 Knochenmarkchimären Mäusen mit und ohne mitochondrial modifizierten Mikroglia. Analysen A) der durchschnittlichen Mikrogliafläche pro A β -Plaque und B) der relativen Plaqueanzahl mit wenigstens 50% Mikrogliaabdeckung ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen APP/PS1-B6xMG^{mtB6} Mäusen und gleichaltrigen APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Tieren zum Zeitpunkt von 100 d. Alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *p < 0.05.

Parallel zu den Ergebnissen bei der Untersuchungen der mikroglialen Aktivierung wurden ebenfalls keine bedeutenden Unterschiede in der A β -Pathologie zwischen den beiden Knochenmarkchimären AD-Mausmodellen gefunden. Die Quantifizierung der Plaqueanzahl lag mit durchschnittlich 212 Plaques pro 10 mm² Kortexfläche in den APP/PS1-B6xMG^{mtB6} Tieren auf dem gleichen Niveau wie bei der APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mauslinie mit 223 Plaques/10 mm² Kortexfläche (Abb.: 27A). Auch beim Flächenanteil, den die gesamten Plaques zusammengenommen im Kortexbereich einnehmen, konnte zwischen den erzeugten APP/PS1-B6 Mausmodellen mit und ohne mitochondrial modifizierten Mikroglia kein spezifischer Unterschied festgestellt werden. Beim Untersuchungspunkt von 100 d lag

die kortikale Plauebedeckung in beiden chimären Mausmodellen bei ungefähr 0,8% (Abb.: 27B). Übereinstimmend dazu zeigte auch die Analyse der Plauegrößenverteilung keine signifikanten Abweichungen zwischen generierten APP/PS1-B6xMG^{mtB6} und APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mäusen (Abb.: 27D). Wie erwartet, ergab außerdem die Bestimmung der zerebralen A β ₄₂-Konzentration keinen Mauslinien-spezifischen Unterschied (Abb.: 27D).

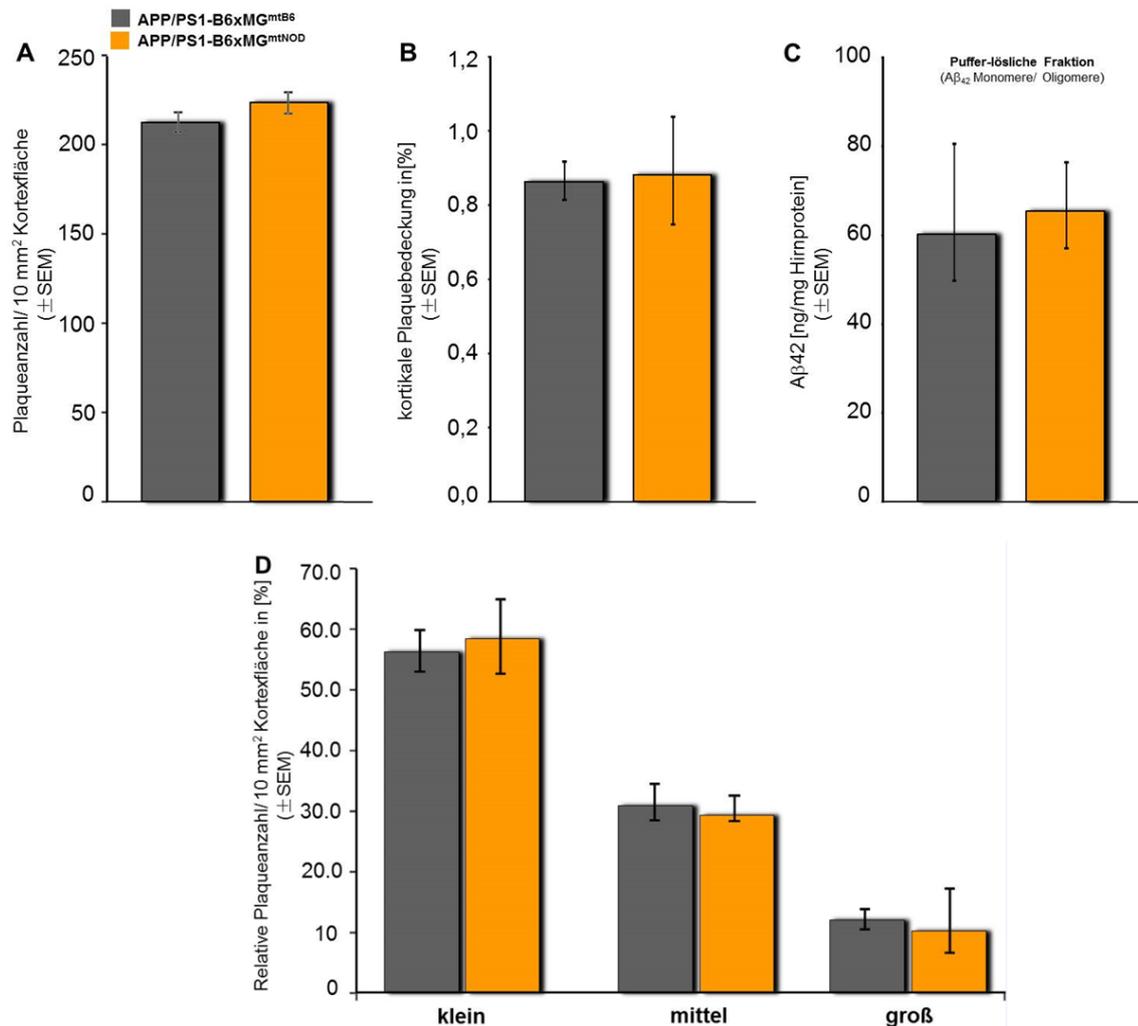


Abb. 27: Unveränderte A β -Pathologie in den APP/PS1-B6 Knochenmarkchimären Mäusen mit und ohne mitochondrial modifizierten Mikroglia. Analysen A) der Plaqueanzahl, B) der kortikalen Plauebedeckung, D) der Plaquegrößen sowie C) die Bestimmung der zerebralen A β ₄₂-Konzentration ergaben keine signifikanten Unterschiede in der A β -Pathologie zwischen APP/PS1-B6xMG^{mtB6} und gleichaltrigen APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mäusen zum Zeitpunkt von 100 d. Alle Messungen wurden auf 10 mm² kortikalen Bereich bzw. auf 1 mg Hirnprobe normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$.

5. Diskussion

Mikroglia sind die Immunzellen des ZNS, die auf pathologische Veränderungen jeglicher Art mit einer Reaktion antworten die allgemein als mikrogliale Aktivierung bezeichnet wird. Der Vorgang der mikroglialen Aktivierung ist sehr komplex und kann in diversen mikroglialen Phänotypen, in Abhängigkeit vom pathologischen Kontext, resultieren⁹⁰.

Die seit längerer Zeit bekannte Assoziation von aktivierten Mikroglia um die charakteristischen amyloiden Ablagerungen stellt ein wesentliches neuropathologisches Merkmal der Alzheimer-Demenz (AD) dar^{212,213}. Jedoch wird die genaue Rolle der Mikroglia in der AD-Pathogenese bis heute kontrovers diskutiert. Dabei existieren weit voneinander abweichende Auffassungen, die den Mikroglia, basierend auf der Fülle ihrer Funktionen als Immunzellen des ZNS, eine neuroprotektive bis hin zu einer neurotoxischen Rolle im Verlauf der Erkrankung zuschreiben^{174,175}. Für eine neuroprotektive Rolle sprechen mehrere Studien, die demonstrieren, dass aktivierte Mikroglia durch A β -Phagozytose sowie der Sekretion von A β -abbauenden Enzymen und neurotrophischen Faktoren in der Lage, sind das Gehirn vor der AD-Pathologie zu schützen^{135,144,176,177}. Im Gegensatz dazu gibt es aber auch ausreichende Hinweise auf eine krankheitsfördernde, zytotoxische Wirkung der Mikroglia. Dabei reagieren die Mikroglia auf die A β -vermittelte Aktivierung durch erhöhte Produktion bzw. Freisetzung an pro-inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie Stickstoffverbindungen und tragen damit so zum charakteristischen Neuronenverlust während der AD bei¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Neueste Erkenntnisse gehen jedoch von einem Wechsel des funktionellen Phänotyps aktivierter Mikroglia im Verlauf der AD-Pathogenese aus. Demnach ist frühe mikrogliale Aktivierung ausgelöst durch die Formation der amyloiden Ablagerungen scheinbar nützlich. Die aktivierten Mikroglia phagozytieren in diesem frühen Stadium der AD das A β und schützen so das Gehirn vor dessen toxischen Effekten. Während die Erkrankung voranschreitet und mit anhaltender Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen verlieren die Mikroglia ihren protektiven Phänotyp sowie ihre Eigenschaft A β -Ablagerungen zu entfernen und unterstützen damit die Plaqueformation¹⁵⁸. Die Unfähigkeit der Mikroglia das A β in den Plaques zu phagozytieren, führt zum Prozess der so genannten „frustrierten Phagozytose“ die schließlich in einer dauerhaften Freisetzung von pro-inflammatorischen Enzymen, ROS und Zytokinen resultiert^{158, 181,182}. Diese Produkte der aktivierten Mikroglia fördern, zusammen mit dem verringerten A β -Abbau, die neuronale Degeneration.

Obwohl alle diese Erkenntnisse und darauf aufbauenden Hypothesen auf zahlreichen Studien basieren, die morphologische Veränderungen, die Expression von bestimmten Zelloberflächenrezeptoren als auch die Freisetzung von biochemischen Substanzen der Mikroglia im Zusammenhang mit der AD untersuchten, ist wenig über die Kinetik der mikroglialen Akkumulierung um die amyloiden Plaques in Verbindung mit der altersbedingten

Zunahme der A β -Pathologie bekannt. Ein besseres Verständnis des Mechanismus durch den die mikrogliale Aktivierung im Verlauf der Erkrankung gesteuert wird, kann zur Aufklärung der präzisen Rolle der Mikroglia in der AD-Pathogenese beitragen. Darüber hinaus könnte in der Regulierung der mikroglialen Aktivierung, im Hinblick auf die neuroprotektiven Effekte ausgehend von den Mikroglia, ein großes Potential für die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien zur Verzögerung der AD-Pathogenese liegen.

Aus diesen Gründen war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Untersuchung der mikroglialen Aktivierung während der AD-Progression im APP/PS1-B6 Mausmodell. Dazu wurde basierend auf computergestützte Auswertung von digitalisierten immunhistochemischen Doppelfärbungen von A β -Plaques und Mikroglia eine detaillierte zeitabhängige Analyse der mikroglialen Aktivierung in den transgenen B6 Tieren vorgenommen. Dabei konnte, in Übereinstimmung mit vorhergehenden Studien, um die entstehenden amyloiden Ablagerungen eine schnell aufkommende Mikrogliose nachgewiesen werden (Abb.: 7)^{133,39}. Das Mikroglia in Richtung sich bildender A β -Plaques migrieren, wurde durch *in vivo*-Imaging Studien eindrucksvoll belegt, die zeigten, dass sich innerhalb von 24 h am Ort der Plauebildung aktivierte Mikroglia befanden^{136,138}. Der im weiteren Krankheitsverlauf beobachtete kontinuierliche Anstieg der durchschnittlichen mikroglialen Fläche pro A β -Plaue, die bei rund 150 d ein Maximum erreichte, stand im Einklang mit der von Bolmont et. al. aufgezeigten zeitabhängigen Zunahme der Anzahl von aktivierten Mikroglia um die amyloiden Ablagerungen¹³⁸. Diese Rekrutierung von zusätzlichen Mikroglia in die unmittelbare Nähe der Ablagerungen kann darauf zurückzuführen sein, dass die bereits Plaue-assoziierten Mikroglia Zytokine wie z. B. IL 6²¹⁴ sowie Chemokine einschließlich des CCL2¹⁶² sezernieren, die als Chemoattraktans für weitere Mikroglia fungieren. Bei der erstmalig durchgeführten quantitativen Analyse der spatialen Beziehung zwischen A β -Plaques und deren assoziierten Mikroglia über mehrere Monate war die Entstehung zweier Plaue-Populationen, die sich auf der Basis ihrer mikroglialen Bedeckung unterschieden, erkennbar (Abb.: 9). Auf der einen Seite waren kleine A β -Ablagerungen mit einer großen Fläche an Mikroglia assoziiert. Dagegen blieb das Verhältnis von Mikrogliafläche zur Plauefläche bei den mit zunehmendem Alter wachsenden Plaques relativ konstant. Die Tatsache, dass die kleinen A β -Plaques, bei denen es sich größtenteils um neu entstandene handelte, mit einem Vielfachen ihrer Fläche von Mikroglia umgeben waren, weist auf eine initial starke Abwehrreaktion der Mikroglia auf die Plauebildung hin. Es konnte in diesem Zusammenhang demonstriert werden, dass es sich bei vielen in der unmittelbaren Nähe der A β -Plaques um neu differenzierte Mikroglia handelt, die aus eingewanderten Blutmonozyten hervorgegangen sind^{146,148}. Diese frisch vom Knochenmark-rekrutierten Mikroglia sind nachweislich in der Lage, das Wachstum der amyloiden Ablagerungen zu begrenzen¹⁴⁸. Ob

Mikroglia das Plaquewachstum dabei als statisch physische Barriere oder durch ihre aufgezeigte Fähigkeit zur A β -Phagozytose begrenzen, bleibt jedoch ungeklärt und ein wichtiger Punkt für weitere Untersuchungen ^{138,181}. Für die neuroprotektive Rolle der anfänglichen mikroglialen Aktivierung sprechen außerdem zusätzlich Studien an transgenen AD-Mausmodellen. So konnte gezeigt werden, dass die genetische Ablation des mikroglialen TLR2- ¹⁸² oder CCR2-Zelloberflächenrezeptors ¹⁶² eine Reduzierung der frühen mikroglialen Akkumulation um die A β -Plaques hervorruft. Infolge dessen, in den transgenen Mausmodellen eine erhöhte A β -Pathologie im Verlauf der AD-Progression zu verzeichnen war. Diese Beobachtung deutet auf einen krankheits-hemmenden Einfluss der anfänglichen mikroglialen Aktivierung während der AD hin.

Das mit der altersabhängigen Zunahme der Plaquegröße festgestellte, relativ stabil bleibende Verhältnis von Plaquefläche zur jeweilig assoziierten Mikrogliafläche, lässt jedoch auf eine Limitierung der anfänglich starken mikroglialen Aktivierung auf wachsende Plaques im fortschreitenden Krankheitsverlauf schließen (Abb.: 9). Diese Annahme wird zusätzlich durch die gleichbleibende durchschnittliche mikrogliale Fläche normiert auf die Anzahl der A β -Ablagerungen zu den späten Zeitpunkten unterstützt (Abb.: 8D). Mit unseren Analysen können wir jedoch nur über die Ursache für die Limitierung der mikroglialen Aktivierung mit steigender Plaquegröße spekulieren. Es ist bekannt, dass Plaque-assoziierte Mikroglia sowohl durch gesteigerte Apoptose sowie Proliferation einen extensiven „Turnover“ (Austausch) durchlaufen ²¹⁵. Von daher ist es vorstellbar, dass aufgrund von Veränderungen im mikroglialen Zelltod bzw. in der mikroglialer Proliferation es zur Stagnierung der anfänglichen starken Abwehrreaktion der Mikroglia im Verlauf des Plaquewachstums kommt. Eine andere Erklärung für dieses Phänomen könnte ebenso in einer veränderten Migration der residenten Mikroglia sowie peripheren Monozyten zu den A β -Plaques, in Folge der fortschreitenden AD-Pathologie liegen ^{183,184}.

Obwohl die Analysen basierend auf den immunhistochemischen Färbungen nur einen bestimmten Moment der mikroglialen Aktivierung widerspiegeln, deuten die gewonnenen Erkenntnisse zusammengenommen auf eine Bifunktionalität der Mikroglia in ihrer dynamischen Interaktion mit den A β -Plaques während der AD-Progression hin. Weiterhin unterstützen sie weitläufig das auf vorangegangenen Studien postulierte Konzept, dass aktivierte Mikroglia verschiedene Rollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf der AD-Pathogenese einnehmen. Demnach kann die initiale mikrogliale Akkumulation um die amyloiden Ablagerungen deren Wachstum beschränken und somit die A β -Pathologie verzögern. Jedoch während fortschreitender Erkrankung und der damit verbundenen chronischen Aktivierung durch A β verlieren die Mikroglia ihren protektiven Phänotyp sowie ihre Eigenschaft, A β zu entfernen. Sie werden dysfunktionell und produzieren anhaltend

Neurotoxine sowie pro-inflammatorische Zytokine, die zum charakteristischen Untergang der Nervenzellen während der AD beitragen ^{157,158,185}.

Die mit dieser Hypothese assoziierte neuroprotektive Rolle der frühen mikroglialen Aktivierung lässt darauf schließen, dass Strategien zur Erhöhung der initialen Akkumulierung der Mikroglia um die amyloiden Ablagerungen für die Behandlung der AD-Erkrankung nützlich sein könnten. Unterstützt wird diese Behauptung durch eine *in vivo* Studie an APP-transgenen Mäusen, bei denen der CC-Chemokinrezeptor 2 (CCR2) ausgeknockt wurde, dessen Hauptligand das Chemokin CCL2, nachweislich eine wichtige Rolle in der mikrogliale Migration spielt ²¹⁶. In diesen Mäusen wurde eine verminderte frühe mikrogliale Akkumulierung um A β -Plaques festgestellt, welche im weiteren Krankheitsverlauf zur einer Erhöhung der amyloiden Ablagerungen führte ¹⁶². Es ist daher von großer Bedeutung, regulatorische Faktoren für die mikrogliale Aktivierung bei der AD zu identifizieren, denn mit dem Wissen spezieller Regulationmechanismen wäre man in der Lage die neuroprotektiv wirkende Rolle der Mikroglia gezielt zu steuern und so als therapeutische Option zu nutzen. Aufgrund der Tatsache, dass die Funktionen des angeborenen Immunsystems, zu dem die Mikroglia gehören, stark von der genetischen Konstitution jedes einzelnen Individuums abhängt ¹⁸⁶, ist eine Beziehung zwischen mikroglialer Antwort und humaner genetischer Variabilität bei der AD-Erkrankung vorstellbar. Diese Annahme wird durch eine kürzlich erschienene Studie unterstützt. In dieser wurde eine Abhängigkeit der mikroglialen Migration von dem, als genetischen Risikofaktor der AD bekannten, ApoE ϵ 4-Allel demonstriert. Dabei konnte auf verschiedene chemotaxische Stimulatoren wie z.B. dem Komplementfaktor 5a und ATP, die im Zusammenhang mit diversen neurodegenerativen Erkrankungen stehen, ein Effekt des ApoE-Polymorphismus nachgewiesen werden, der eine reduzierte mikrogliale Migration zu den spezifischen krankheitsbedingten Läsionen nach sich zog ¹⁸⁷. Abgesehen davon ist gegenwärtig jedoch wenig über die Rolle der humanen genetischen Heterogenität auf die mikrogliale Aktivierung während der AD-Pathogenese bekannt. Deshalb können Analysen über den Einfluss der genetischen Heterogenität auf die Reaktivität der Mikroglia anhand von vergleichenden Untersuchungen in AD-transgenen Mausinzuchtstämmen mit unterschiedlichen genomischen Hintergründen zu einem besseren Verständnis des krankheitsbedingten Mechanismus der mikroglialen Aktivierung beitragen. Außerdem führen derartige Untersuchungen zur Identifizierung von genetischen Faktoren, die die mikrogliale Aktivierung regulieren. So konnte gezeigt werden, dass der unterschiedliche genomische Hintergrund von transgenen WKY72 und SHR72 Ratten, die mikrogliale Antwort in einem Modell der Tauopathie moduliert und dies mit einer veränderten Pathologie der neurofibrillären Bündel einherging. Eine erhöhte mikrogliale MHCII Expression, die einen effizienten phagozytischen Phänotypen der Mikroglia widerspiegelt, war mit einer signifikanten reduzierten finalen Belastung an neurofibrillären Bündel in den transgenen WKY72 Ratten verbunden ¹⁸⁸.

In Anbetracht dessen war eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit, den Einfluss des genetischen Hintergrundes von Mausinzuchtstämmen auf die mikrogliale Aktivierung während der AD-Pathogenese zu untersuchen. Dazu wurde das APP/PS1 Mausmodell zusätzlich mit dem FVB/N Inzuchtstamm kombiniert und die mikrogliale Aktivierung vergleichend zu APP/PS1 transgenen Tieren im genetischen B6 (C57BL/6) Hintergrund analysiert. Aufgrund der genetischen Heterogenität zwischen dem B6 und FVB Inzuchtstamm wurden beide bereits für die Identifizierung von genetischen Modulatoren, die die klinische Variabilität bei einer Diabeteserkrankung beeinflussen, verwendet. Dabei konnte in ob/ob Mäusen, einem etablierten Tiermodell der Diabeteserkrankung vom Typ II, trotz ähnlichem Grad an Fettleibigkeit und zirkulierenden Insulins, eine modeste Diabetes in den ob/ob Mäusen mit dem genetischen B6 Hintergrund, im Gegensatz zu den stark hyperglykämischen ob/ob-FVB Mäusen, aufgezeigt werden ¹⁸⁹. Zusätzlich sind sowohl der B6 als auch der FVB Mausstamm in Verbindung mit altersabhängigen ZNS-Erkrankungen einschließlich der AD sehr gut charakterisiert ¹⁷⁰.

Die im APP/PS1 Mausmodell frühzeitig auftretende und mittlerweile detailliert beschriebene A β -Pathologie wird durch die Überexpression von zwei humanen Transgenen, einem mutierten Präsenilin1-Gen und einem APP-Gen mit der schwedischen Doppelmutation, induziert. Da sowohl das PS1- als auch das APP_{swe}-Transgen unter der Kontrolle des Thy1-Promotors stehen, der eine postnatale und neuronspezifische Expression gewährleistet, ist von einer nahezu identischen A β -Produktion in den APP/PS1-transgenen B6 und FVB Mausstämmen zurechnen ¹⁶³. Somit ist davon auszugehen, dass sich beide transgene Mausstämme nicht in ihrer anfänglichen zerebralen A β -Konzentration und dem daraus resultierenden Prozess der Plaquebildung unterscheiden. Mit dieser Voraussetzung konnte die mikrogliale Aktivierung ausschließlich in Abhängigkeit von der genetischen Konstitution der transgenen Inzuchtstämme untersucht werden, ohne einen möglichen Effekt einer unterschiedlichen Mausstamm-bedingten initialen A β -Pathologie zu berücksichtigen. Die dabei mittels semi-automatisierten Verfahrens durchgeführten zeitabhängigen Analysen offenbarten einen signifikanten Einfluss des genomischen Hintergrundes der transgenen Mausinzuchtstämme auf mikrogliale Akkumulation um die A β -Plaques. In Korrelation zu einer wesentlich erhöhten mikroglialen Aktivierung war in den transgenen FVB Mäusen eine abgeschwächte A β -Pathologie gegenüber der APP/PS1-B6 Mauslinie im finalen Stadium der AD-Progression feststellbar. Diese veränderte A β -Pathologie deutet an, dass die Mausstamm-spezifischen Unterschiede in der mikroglialen Aktivierung zusätzlich mit Auswirkungen auf die zerebrale Amyloidose verbunden waren.

Das die mikrogliale Aktivierung durch die Bildung der A β -Plaques ausgelöst wird ^{39,136,138}, konnte anhand einer schnell aufkommenden Mikrogliose um die ersten auftretenden amyloiden Ablagerungen in beiden APP/PS1-Mauslinien bestätigt werden. Sowohl in der

transgenen B6 als auch FVB Mauslinie war eine Zunahme dieser reaktiven Mikroglie parallel zur der steigenden Anzahl der A β -Plaques mit zunehmenden Alter der Tiere erkennbar. Die quantitativen Analysen der temporären sowie spatialen Verteilung der Mikroglia um die amyloiden Ablagerungen ergaben jedoch bedeutende Mausstamm-spezifische Unterschiede in der mikroglialen Aktivierung. Zum einem war die durchschnittliche mikrogliale Fläche pro A β -Plaque im transgenen FVB Mausstamm bereits ab der frühen Phase der AD-Progression dramatisch, im Vergleich zum APP/PS1-B6 Mausstamm, erhöht (Abb.: 12A). Des Weiteren konnte im Zusammenhang mit der altersbedingten Entstehung zweier Plaquepopulationen, die sich in ihrer mikroglialen Bedeckung unterschieden, ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden transgenen Inzuchtstämmen festgestellt werden (Abb.: 12B, C). Dabei war die Gruppe an amyloiden Ablagerungen, die eine massive Mikrogliaabdeckung aufwies, über die gesamte Untersuchungsperiode mit Ausnahme bei 50 d im transgenen FVB Mausstamm wesentlich größer. Dies spricht für eine stärkere anfängliche Abwehrreaktion der Mikroglia in den transgenen FVB Mäusen gegenüber den B6 Tieren.

Zusammengenommen weisen die gewonnenen Daten auf einen Effekt des genomischen Hintergrundes auf die mikrogliale Akkumulierung um die A β -Plaques hin. Eine mögliche Erklärung dafür kann in einer veränderte Migration der residenten Mikroglia aber auch der vom Knochenmark abgeleiteten rekrutierten Monozyten zu den A β -Ablagerungen innerhalb beider transgenen Inzuchtstämmen liegen. In verschiedenen Studien an genetisch veränderten Tiermodellen wurde belegt, dass bestimmte Zytokine wie IL1 β ¹⁶¹ sowie Chemokine einschließlich CCL2, ¹⁶² und CX3CL-1 ¹⁸³ eine entscheidende Rolle auf die Akkumulierung von residenten Mikroglia als auch von peripheren Monozyten um die A β -Plaques besitzen. Von daher ist es denkbar, dass eine unterschiedliche Expression von Zytokinen oder Chemokinen in verschiedenen transgenen Mausstämmen einen genetisch regulierenden Faktor für die Migration der Mikroglia zu den A β -Plaques darstellt. Unterstützung erhält diese Annahme durch eine Arbeit von Graber *et.al.*, in der in Abhängigkeit vom genomischen Hintergrund verschiedener Mausinzuchtstämmen eine veränderte Expression von mehreren Genen gefunden wurde, die in Verbindung mit der Aktivierung der Immunantwort bei Verletzung des ZNS und neurologischen Erkrankungen stehen. Neben Genen von pro-inflammatorischen Mediatoren der klassischen Immunantwort waren auch selektive Veränderungen im Expressionsprofil von IL1 β sowie CCL2 zu finden ¹⁹⁰. Angesichts der Tatsache, dass Mikroglia in unmittelbarer Nähe des pathologischen Geschehens eine extensive Proliferation durchlaufen, könnte eine veränderte lokale Proliferation der A β -Plaque assoziierten Mikroglia als weitere Erklärung für die Mausstamm-spezifischen Unterschiede in der mikroglialen Aktivierung in Frage kommen ¹⁸⁴. Es ist bekannt, dass Mikroglia in Antwort auf A β in der Lage sind, den für ihre Proliferation

wichtigen Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) zu produzieren ¹⁹¹. Eine unterschiedliche Stimulierung der mikroglialen Proliferation aufgrund von Differenzen in der M-CSF Expression kann von daher ebenfalls eine mögliche Begründung für die gefundenen Unterschiede in der Akkumulierung der Mikroglia um die A β -Plaques zwischen beiden transgenen Mauslinien sein. Zukünftige Expressionsanalysen im Hinblick auf die genetische Konstitution der verwendeten Mausinzuchtstämme sind jedoch nötig, um zu klären, ob eine veränderte Migration bzw. Proliferation der Mikroglia zu den A β -Plaques bewirkt durch eine unterschiedliche Expression von bestimmten Zytokinen / Chemokinen für die Mausstamm-spezifischen Unterschiede in der mikrogliale Aktivierung verantwortlich sind. Dessen ungeachtet konnte durch die zeitabhängige Charakterisierung der mikroglialen Aktivierung in beiden APP/PS1 Mauslinien erstmalig ein bedeutender modulierender Effekt der genetischen Konstitution auf die mikrogliale Akkumulierung in Assoziation mit den A β -Ablagerungen nachgewiesen werden.

Um potentielle Auswirkungen der unterschiedlichen mikroglialen Aktivierung auf das Krankheitsbild der AD zu identifizieren, wurde die A β -Pathologie in beiden transgenen Mauslinien analysiert. Dabei konnte im transgenen FVB Mausstamm eine abgeschwächte A β -Pathologie gegenüber dem B6 Mausstamm im finalen Stadium der AD-Progression festgestellt werden. Zu den späten Zeitpunkten waren sowohl die zerebrale A β_{42} -Konzentration als auch die Plaqueanzahl in den FVB Mäusen signifikant geringer als in den B6 Tieren (Abb.: 14 und 16). Dieses Ergebnis bestätigt andere epidemiologische Studien, die einen Effekt des genomischen Hintergrundes sowohl auf den A β -Gehalt als auch auf die Anzahl der amyloiden Ablagerungen in AD-Mausmodellen demonstrierten ¹⁹²⁻¹⁹⁵. Obwohl gezeigt wurde, dass der genetischen Hintergrund von transgenen Mausstämmen die APP-Prozessierung beeinflussen kann und dies mit einer veränderten A β -Produktion sowie einer unterschiedlichen Ausbildung von amyloiden Ablagerungen verbunden ist ¹⁹², war wie erwartet kein wesentlicher Unterschied in der initialen A β -Konzentration sowie Plaqueanzahl zwischen beiden transgenen Mausstämmen ersichtlich (Abb.: 14 und 16). Angesichts dessen lässt sich vermuten, dass die beobachteten Unterschiede in der finalen A β -Pathologie zu mindestens zum Teil auf die Mausstamm-spezifischen Unterschiede in der mikroglialen Aktivierung zurückzuführen sind. Dass eine veränderte mikrogliale Aktivierung sowohl den zerebralen A β -Gehalt als auch die Anzahl der amyloiden Ablagerungen beeinträchtigen kann, wurde bereits in mehreren Studien an AD-transgenen Tiermodellen gezeigt. Im Allgemeinen war in diesen Studien eine erhöhte mikrogliale Aktivierung zumeist mit einer reduzierten A β -Pathologie verbunden ^{183,196,197}.

Daher ist es nachvollziehbar, dass die erhöhte mikrogliale Aktivierung in den transgenen FVB Mäusen eine effizientere A β -Beseitigung bewirkt und damit zu einer Reduzierung in der finalen Plaqueanzahl beiträgt, obgleich das anhand der durchgeführten Analysen nicht

eindeutig geklärt werden konnte. Den anschaulichsten Effekt, der durch den genomischen Hintergrund bedingten unterschiedlichen mikroglialen Aktivierung, auf die A β -Pathologie lieferten jedoch die beobachteten Differenzen in der Plaquegrößenverteilung zwischen beiden transgenen Mausstämmen (Abb.:15). In Verbindung mit der festgestellten erhöhten mikroglialen Aktivierung war in den transgenen FVB Mäusen, neben einer verlangsamten Reduzierung des Anteils an kleinen Plaques, eine weniger ausgeprägte Ausbildung an flächenmässig großen Plaques im Vergleich zu den APP/PS1-B6 Tieren über die Zeit feststellbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die seit der frühen Phase der Plaquebildung, vergrößerte mikroglialen Anreicherungen um die A β -Plaques in den transgenen FVB Mäusen, das Wachstum der amyloiden Ablagerungen effizienter einschränkt als in den APP/PS1-B6 Tieren. Deshalb kommt es zwischen beiden APP/PS1-Mausstämmen zu einer signifikant unterschiedlichen Verteilung von kleinen und großen Plaques im Verlauf der AD-Pathogenese, die im finalen Stadium der Erkrankung zu einem verringerten Flächenanteil der gesamten Plaques im Kortexbereich der APP/PS1-FVB Mäuse führt (Abb.: 14) . Die aufgezeigte Korrelation zwischen verändertem Plaquewachstum und Mausstamm-spezifischer Unterschiede in der mikroglialen Aktivierung bestätigt die Annahme einer Mikroglia-abhängigen Restriktion des Plaqueswachstums^{136,138}. Das relativ gleichbleibende Verhältnis des Anteils kleiner und großer A β -Plaques zwischen beiden transgenen Mausstämmen in Verbindung mit dem konstanten Plateau in der mikroglialen Plaquebedeckung sowohl in den transgenen B6- als auch in den FVB Mäusen, steht im Einklang mit dem postulierten funktionellen Phänotypenwechsel der Mikroglia im Verlauf der AD-Pathogenese (Abb.: 12 und 15)^{157,158,185}.

Nicht nur im APP/PS1-B6 sondern auch im APP/PS1-FVB Mausstamm geht die anfängliche neuroprotektive Wirkung der Mikroglia, im Hinblick auf die Beschränkung des Plaquewachstums, verloren und wandelt sich in eine potentiell krankheitsfördernde Reaktion um. Ob die letztendlich reduzierte finale A β -Belastung in den transgenen FVB Tieren nur durch die initial höhere mikrogliale Abwehrreaktion auf die amyloiden Ablagerungen zurück zuführen ist, oder auch durch einen länger anhaltenden neuroprotektive Phänotyp der Mikroglia bewirkt wird, lässt sich allerdings nur spekulieren. Grundsätzlich jedoch deuten die beobachteten Veränderungen in der A β -Pathologie zwischen beiden Mauslinien an, dass die durch den genomischen Hintergrund bedingte erhöhte mikrogliale Aktivität in den transgenen FVB Mäusen neuroprotektiv ist. Die Identifizierung von spezifischen Genen, die die mikroglialen Aktivierung in Bezug auf diese neuroprotektive Wirkung regulieren, sollte von daher neue Perspektiven für die Behandlung der AD eröffnen. Neben dem festgestellten Einfluss der genetischen Konstitution auf die A β -vermittelte mikrogliale Aktivierung zeigten andere Studien bereits, dass die genetische Heterogenität innerhalb von verschiedenen Mausinzuchtstämmen, die Modulation von charakteristischen Merkmalen der AD-Pathologie bewirken¹⁹⁴. Dies bestätigt die allgemeine Theorie, dass der genomische Hintergrund in der

Arbeit mit Tiermodellen von humanen Erkrankungen nicht vernachlässigbar ist. Aufgrund der genetischen Unterschiede zwischen den zahlreichen Mausinzuchtstämmen, die für die AD-Forschung verwendet werden, sind experimentelle Daten kaum vergleichend auswertbar, was eine korrekte Interpretation der Ergebnisse erschwert²¹. Jedoch stellt der beobachtete signifikante Effekt des genomischen Hintergrundes verschiedener transgener Mausstämmen auf bestimmte Erkrankungsmerkmale der AD, eine potentielle Quelle für die Identifizierung genetisch regulierender Faktoren der AD-Pathogenese dar²¹.

Neben der aufgezeigten Beeinflussung der mikroglialen Antwort durch genetische Faktoren ist in der Literatur beschrieben, dass die Funktionen der Mikroglia stark vom extrazellulären sowie intrazellulären Energiehaushalt abhängen¹⁹⁸. Die nachgewiesene Assoziation von mitochondrialer Dysfunktion bei verminderter Energieproduktion und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen der AD lassen auf einen Zusammenhang zwischen krankheitsbedingten Mutationen im mitochondrialen Genom und mikroglialer Aktivierung im Verlauf der AD-Pathogenese schließen^{103,172}. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die mikrogliale Aktivierung hinsichtlich der A β -Belastung in zwei APP/PS1 transgenen Mauslinien untersucht, die das nukleäre Genom des B6 Mausstammes besaßen, sich jedoch im mitochondrialen Genom spezifisch unterschieden. Die dafür generierte konplastische APP/PS1-B6xmtNOD Mauslinie wies dabei spezifische mitochondriale DNA Variationen gegenüber der APP/PS1-B6 Mauslinie auf, die zwei Enzyme der Atmungskette, die NADH Dehydrogenase 3 und die Cytochrom C Oxidase sowie die tRNA für Arginin betrafen¹⁶⁵. Diese somatischen Veränderungen im mitochondrialen Genom resultieren in einem veränderten zerebralen Energiegehalt zwischen beiden Mauslinien, der ebenso mit einer unterschiedlichen mikroglialen Aktivierung verbunden war (Abb.: 17 und 18). In den APP/PS1-B6xmtNOD Mäusen, die eine höhere zerebrale ATP-Konzentration aufwiesen, konnte eine durchschnittlich größere mikrogliale Plaquebedeckung im Vergleich zu den APP/PS1-B6 Tieren festgestellt werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine ATP-abhängige Akkumulation der Mikroglia um die A β -Plaques hin. Das ATP, abgegeben von beschädigten oder verletzten Neuronen, die Chemotaxis von Mikroglia zum Ort des pathologischen Geschehens vermittelt, wurde durch Arbeiten von Davalos *et al.* und Haynes *et al.* bereits gezeigt^{107,199}. Eine solche, aufgrund des mitochondrialen Genpolymorphismus veränderte ATP-vermittelte Chemotaxis der Mikroglia, könnte auch die aufgezeigten Mausstamm-spezifischen Unterschiede in der mikroglialen Akkumulation um die A β -Plaques zwischen den transgenen B6 und FVB Mäusen erklären. Ähnlich, wie das Resultat der A β -Analyse in diesen beiden APP/PS1 Mauslinien, war die erhöhte mikrogliale Aktivität in den mitochondrial veränderten Tieren (APP/PS1-B6xmtNOD) mit einer signifikant reduzierten Plaqueanzahl im finalen Krankheitsstadium gegenüber den APP/PS1-B6 Mäusen verbunden. Dieses Ergebnis unterstützt die bereits aufgestellte Vermutung von einer größeren Wirksamkeit der erhöhten mikroglialen Aktivierung in der A β -Beseitigung, die zur

Reduzierung der finalen Plaqueanzahl beiträgt. In Übereinstimmung mit dieser Theorie konnte ein Einfluss des mitochondrialen Polymorphismus auf den funktionellen Phänotypen der Mikroglia nachgewiesen werden. Die Mikroglia mit den mitochondrialen DNA-Modifikationen besaßen eine signifikante höhere A β -Phagozytoseaktivität verglichen mit den mtB6 Mikroglia (Abb.: 20). Obwohl beschrieben ist, dass ATP hauptsächlich als extrazellulärer Botenstoff durch die Stimulierung des Purinrezeptors eine Anzahl mikroglialer Funktionen beeinflussen kann, wird durch die erhöhte Phagozytoseaktivität der mtNOD Mikroglia ein Effekt des intrazellulären Energiegehalts auf den funktionellen mikroglialen Phänotyp ersichtlich^{199,200}.

Zusammenfassend betrachtet, lässt die aufgedeckte Verknüpfung zwischen dem veränderten ATP-Gehalt, aufgrund des mitochondrialen Polymorphismus, und der veränderten mikroglialen Antwort hinsichtlich der Plaquebedeckung und A β -Phagozytoseaktivität eine direkte Verbindung von krankheitsbedingt-hervorgerufener mitochondrialer Dysfunktion und mikroglialer Reaktion im Rahmen der AD erkennen.

Bezüglich dieses postulierten Zusammenhangs sollte zusätzlich die Frage beantwortet werden, ob die mikrogliale Aktivierung dabei durch DNA-Mutationen in ihren eigenen Mitochondrien oder durch Auswirkungen von somatisch auftretenden mitochondrialen Veränderungen im gesamten AD-Gehirn beeinflusst wird. Dazu wurden im Verlauf der vorliegenden Studie erstmalig APP/PS1 transgene Mäuse erzeugt, bei denen spezifische Veränderungen des mitochondrialen Genoms nur auf die Mikroglia beschränkt waren. Aufgrund der Tatsache, dass zirkulierende Blutmonozyten gerade unter pathologischen Bedingungen das ZNS-Parenchym infiltrieren und dort zu Mikroglia differenzieren²⁰¹⁻²⁰³, erfolgte hierzu die Generierung von Knochenmarkchimären Mäusen. Dazu bekamen bestrahlte APP/PS1-B6 Empfängertiere eine Transplantation von Knochenmark, das GFP-markierte hämatopoetische Stammzellen mit den mitochondrialen NOD-Veränderungen enthielt. Durch Fluoreszenz-mikroskopische Quantifizierung an Hirnschnitten konnte festgestellt werden, dass circa ein Drittel der gesamten Mikroglia in den so generierten APP/PS1-B6 Chimären, die NOD-Modifikation in ihrer mitochondrialen DNA aufwies (Abb.: 24). Obwohl argumentiert wird, dass eine Bestrahlung die Bluthirnschranke beschädigt und so eine Infiltration von Zellen in das zerebrale Parenchym fördert⁹⁰, war dieses Ergebnis konform mit Daten aus anderen Studien. Diese zeigten eine massive Invasion von Knochenmark-abstammenden Blutmonozyten in das Gehirn von AD-transgenen Mäusen und belegten somit eine Beteiligung peripherer Monozyten an der mikroglialen Antwort im Verlauf der Erkrankung^{146,148,204}. Ähnlich wie in den Arbeiten von Malm *et. al.* und Stadler *et. al.* beschrieben, dass lediglich eine Subpopulation der A β -Plaques von infiltrierten Zellen umgeben war^{146,204}, konnten die mitochondrial veränderten Mikroglia nur in der Nähe von einigen amyloiden Ablagerungen lokalisiert werden (Abb.: 25). Diese Beobachtung ist damit erklärbar, dass die Rekrutierung von aus dem Knochenmark-abgeleiteten Mikroglia

hauptsächlich in der frühen Phase der Plaquebildung erfolgt ¹⁴⁶. Infolgedessen waren initial entstandene Plaques neben residenten Mikroglia auch mit den mitochondrial modifizierten Mikroglia umgeben, wohingegen die im weiteren Krankheitsverlauf gebildeten A β -Ablagerungen keine Assoziation mehr mit den mitochondrial veränderten Mikroglia aufwiesen. Um eine mögliche Auswirkung der spezifischen mitochondrialen DNA-Veränderungen in einem Drittel der Mikroglia, auf die gesamte mikrogliale Aktivierung am besten verifizieren zu können, wurden daher die generierten Chimäre in einen frühen Stadium der Erkrankung (100 d) untersucht. Im Vergleich zu gleichaltrigen chimären APP/PS1-B6 Kontrolltieren, die keine mitochondrial modifizierten Mikroglia besaßen, konnte in den generierten APP/PS1-B6xMG^{mtNOD} Mäusen mit den teilweise mitochondrial veränderten Mikroglia kein signifikanter Unterschied in der mikroglialen Aktivierung festgestellt werden (Abb.: 26). Im Hinblick auf den, in dieser Arbeit und durch weitere Studien, bereits gezeigten Einfluss einer veränderten mikroglialen Aktivierung auf die A β -Pathologie waren ebenfalls keine Unterschiede in der Plaqueanzahl, im zerebralen A β -Gehalt sowie in der Plaquegrößenverteilung zwischen den beiden chimären Mauslinien erkennbar (Abb.: 27) ^{183,196,197}. Die, trotz nachgewiesener erhöhter A β -Phagozytoseaktivität der mtNOD Mikroglia, unveränderte A β -Konzentration als auch die gleiche Aufteilung der Plaquegrößen waren dabei konträr zu der Annahme, dass die von Knochenmark abstammenden Mikroglia eine höhere Effizienz in der Verzögerung des Fortschreitens der AD besitzen als ihrer residenten Ebenbilder ¹⁴⁸. Ob die erhöhte Phagozytosefähigkeit der mtNOD Mikroglia die A β -Belastung im finalen Stadium der AD beeinflusst, müsste durch vergleichende Analysen der A β -Pathologie von älteren Tieren (z.B. 200 d) in beiden chimären Mauslinien jedoch zusätzlich geklärt werden.

Diese Ergebnisse deuten an, dass die A β -vermittelte mikrogliale Aktivierung weitaus mehr von Veränderungen in der zerebralen Umgebung als von intrazellulären physiologischen Bedingungen abhängt. Dabei beeinflusst insbesondere der extrazelluläre ATP-Gehalt sowohl die mikrogliale Migration zu den A β -Plaques als auch den funktionellen Phänotyp der Mikroglia, was zusammen genommen einen gravierenden Effekt auf die A β -Proteostase im Verlauf der AD-Pathogenese zur Folge hat. Diese Erkenntnis unterstützt viele Studien, die zeigten, dass ATP in der Lage ist, eine Anzahl von mikroglialen Funktionen zu vermitteln, die bei der Verteidigung des Gehirns gegen eindringende Pathogene und andere Formen von Hirngewebsverletzungen involviert sind ^{103,104,205,206}.

Zusammenfassend lässt sich aus den präsentierten Daten der vorliegenden Arbeit eine enorme Komplexität der mikroglialen Aktivierung während der AD-Erkrankung feststellen. Die Erkenntnis einer initial starken Abwehrreaktion der Mikroglia auf entstehende amyloide Plaques, die aber im weiteren Krankheitsverlauf ins Stagnieren gerät, unterstützt das Konzept von einem funktionellen Phänotypenwechsel der Mikroglia während der AD-

Progression. Ein anfänglich neuroprotektiver mikroglialer Phänotyp, bezüglich A β -Beseitigung und Restriktion des Plaquewachstums, geht aufgrund der chronischen Aktivierung durch A β im fortschreitenden Krankheitsprozess verloren. Infolgedessen werden die Mikroglia dysfunktionell und gelangen in den Verdacht, die AD-Pathologie zu fördern. Der demonstrierte Einfluss des genomischen Hintergrundes transgener AD-Mausstämme auf die mikrogliale Aktivierung zeigt, dass die genetische Konstitution jedes einzelnen Individuums einen entscheidenden Einfluss auf die mikrogliale Antwort im Verlauf der AD besitzt. Zusätzlich konnte - durch die nachgewiesene Abhängigkeit der mikroglialen Reaktion vom zerebralen Energiegehalt - eine direkte Verbindung zwischen krankheitsbedingt hervorgerufener mitochondrialer Dysfunktion und mikroglialer Aktivierung in der AD festgestellt werden.

Da in beiden aufgedeckten Regulationsmechanismen ein Zusammenhang zwischen veränderter mikroglialer Aktivierung und reduzierter A β -Belastung bestand, lässt sich schlussfolgern, dass sowohl individuell genetische Faktoren als auch ein ausgeglichener zerebraler Energiehaushalt beim Ausbruch der AD-Erkrankungen, den anfänglichen neuroprotektiven wirkenden Phänotyp der Mikroglia unterstützen. Im weiteren Verlauf der AD-Pathogenese kommt es jedoch aufgrund von krankheitsbedingten hervorgerufenen Mutationen im mitochondrialen Genom von allen Zelltypen des Gehirns zur einer verminderten zerebralen Energiekonzentration, diese sich hemmend auf den neuroprotektiven Phänotypen auswirkt und somit einen Wechsel zu einem neurotoxischen mikroglialen Phänotypen fördert (Abb.:28).

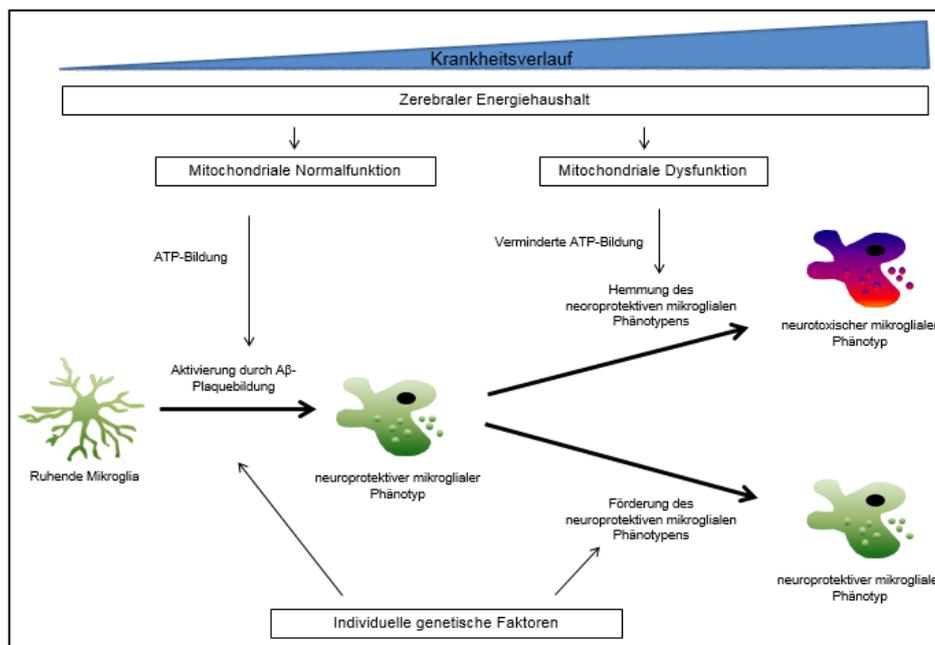


Abb. 28: Schema der mikroglialen Aktivierung bei der Alzheimer Demenz mit Einfluss von sowohl individuellen genetischen Faktoren und dem zerebralen Energiehaushalt auf den mikroglialen Phänotypen.

Mit dem Wissen das ein anfänglich neuroprotektive wirkender Phänotyp der Mikroglia, hinsichtlich A β -Beseitigung und Beschränkung des Plaquewachstums durch individuelle genetische Faktoren sowie einem ausgeglichenen zerebralen Energiehaushalt gefördert werden kann, ist es denkbar dass eine gezielte Mikrogliaaktivierung in Zukunft eine therapeutische Option für die Verzögerung der AD-Progression darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Dugu, M., Neugroschl, J., Sewell, M. & Marin, D. Review of dementia. *Mt. Sinai J. Med.* **70**, 45–53 (2003).
2. Jellinger, K. A. Alzheimer 100--highlights in the history of Alzheimer research. *J. Neural Transm.* **113**, 1603–23 (2006).
3. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeits Psychi- atry Psych. Med* **64**, 146–8 (1907).
4. Maurer, K., Volk, S. & Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **349**, 1546–9 (1997).
5. Zilka, N. & Novak, M. The tangled story of Alois Alzheimer. *Bratisl. Lek. Listy* **107**, 343–345 (2006).
6. Czech, C., Tremp, G. & Pradier, L. Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. *Prog. Neurobiol.* **60**, 363–84 (2000).
7. Villars, H. *et al.* [Alzheimer's disease and syndromes related to the severe stage]. *Rev. Neurol. (Paris)*. **164 Spec N**, F98–106 (2008).
8. Plassman, B. L. *et al.* Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study. *Neuroepidemiology* **29**, 125–32 (2007).
9. Ferri, C. P. *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**, 2112–7 (2005).
10. Russo, C. *et al.* The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: Physiological and pathological implications. in *Brain Res. Rev.* **48**, 257–264 (2005).
11. Bracco, L. *et al.* Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study. *Arch. Neurol.* **51**, 1213–1219 (1994).
12. Maurer, K. & Hoyer, S. Alois Alzheimer revisited: differences in origin of the disease carrying his name. *J. Neural Transm.* **113**, 1645–1658 (2006).
13. Thinakaran, G. & Parent, A. T. Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease. *Pharmacol. Res.* **50**, 411–8 (2004).
14. Terry, R. D. & Katzman, R. Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* **14**, 497–506 (1983).
15. Findeis, M. A. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Ther.* **116**, 266–286 (2007).
16. Lahiri, D. K., Sambamurti, K. & Bennett, D. A. Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: Molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **25**, 651–660 (2004).
17. Saunders, A. M. *et al.* Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1467–72 (1993).
18. Corder, E. H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921–923 (1993).
19. Mayeux, R. & Ottman, R. Alzheimer's disease genetics: home runs and strikeouts. *Ann. Neurol.* **44**, 716–9 (1998).
20. Blomqvist, M. E.-L. *et al.* Towards compendia of negative genetic association studies: an example for Alzheimer disease. *Hum. Genet.* **119**, 29–37 (2006).
21. Ryman, D. & Lamb, B. T. Genetic and environmental modifiers of Alzheimer's disease phenotypes in the mouse. *Curr. Alzheimer Res.* **3**, 465–473 (2006).
22. Swerdlow, R. H. & Khan, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: An update. *Exp. Neurol.* **218**, 308–315 (2009).
23. Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E. & Pelicci, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 722–8 (2007).
24. Mancuso, M., Orsucci, D., Siciliano, G. & Murri, L. Mitochondria, mitochondrial DNA and Alzheimer's disease. What comes first? *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 457–468 (2008).
25. Mancuso, M., Coppedè, F., Murri, L. & Siciliano, G. Mitochondrial cascade hypothesis of Alzheimer's disease: myth or reality? *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 1631–1646 (2007).
26. Guix, F. X., Urbesalgo, I., Coma, M. & Muñoz, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog. Neurobiol.* **76**, 126–52 (2005).
27. Nunomura, A. *et al.* Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **17**, 108–113 (2004).
28. Nunomura, A. *et al.* Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 759–67 (2001).
29. Mancuso, M., Coppede, F., Migliore, L., Siciliano, G. & Murri, L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J. Alzheimers. Dis.* **10**, 59–73 (2006).

30. Baloyannis, S. J. Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **9**, 119–126 (2006).
31. Mutisya, E. M., Bowling, A. C. & Beal, M. F. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **63**, 2179–2184 (1994).
32. Radak, Z. *et al.* Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **20**, 777–783 (2010).
33. Stern, Y., Alexander, G. E., Prohovnik, I. & Mayeux, R. Inverse relationship between education and parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **32**, 371–375 (1992).
34. Pope, S. K., Shue, V. M. & Beck, C. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu. Rev. Public Health* **24**, 111–132 (2003).
35. Przedborski, S., Vila, M. & Jackson-Lewis, V. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J. Clin. Invest.* **111**, 3–10 (2003).
36. Bayer, T. A. New insights into Alzheimer's disease: "modeling neurodegeneration - causes and consequences". *Genes. Brain. Behav.* **7 Suppl 1**, iv (2008).
37. De Strooper, B. & Annaert, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 1)**, 1857–1870 (2000).
38. Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487–98 (1991).
39. Frautschy, S. A. *et al.* Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **152**, 307–317 (1998).
40. Muller-Hill, B. & Beyreuther, K. Molecular Biology of Alzheimer's Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 287–307 (1989).
41. Stromer, T. & Serpell, L. C. Structure and morphology of the Alzheimer's amyloid fibril. *Microsc. Res. Tech.* **67**, 210–7 (2005).
42. Masters, C. L. *et al.* Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4245–4249 (1985).
43. Selkoe, D. J. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1054–1061 (2004).
44. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
45. Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055–1058 (1993).
46. Hardy, J., Duff, K., Hardy, K. G., Perez-Tur, J. & Hutton, M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat. Neurosci.* **1**, 355–358 (1998).
47. Pastorino, L. & Lu, K. P. Pathogenic mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **545**, 29–38 (2006).
48. Daigle, I. & Li, C. apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 12045–12049 (1993).
49. Moechars, D., Lorent, K., De Strooper, B., Dewachter, I. & Van Leuven, F. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* **15**, 1265–1274 (1996).
50. Sisodia, S. S., Koo, E. H., Hoffman, P. N., Perry, G. & Price, D. L. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J. Neurosci.* **13**, 3136–3142 (1993).
51. Zheng, H. & Koo, E. H. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* **1**, 5 (2006).
52. Zheng, H. & Koo, E. H. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol. Neurodegener.* **6**, 27 (2011).
53. Abad, C., Martínez-Gil, L., Tamborero, S. & Mingarro, I. Membrane topology of gp41 and amyloid precursor protein: Interfering transmembrane interactions as potential targets for HIV and Alzheimer treatment. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1788**, 2132–2141 (2009).
54. Neve, R. L., McPhie, D. L. & Chen, Y. Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* **886**, 54–66 (2000).
55. Suh, Y.-H. & Checler, F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **54**, 469–525 (2002).
56. Luo, L., Tully, T. & White, K. Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene. *Neuron* **9**, 595–605 (1992).
57. Moya, K. L., Benowitz, L. I., Schneider, G. E. & Allinquant, B. The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev. Biol.* **161**, 597–603 (1994).

58. Mucke, L. *et al.* Synaptotrophic effects of human amyloid β protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Res.* **666**, 151–167 (1994).
59. Selkoe, D. & Kopan, R. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 565–597 (2003).
60. Small, D. H. *et al.* Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **1**, 275–285 (1999).
61. Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. & Abraham, W. C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* **70**, 1–32 (2003).
62. Oster-Granite, M. L., McPhie, D. L., Greenan, J. & Neve, R. L. Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* **16**, 6732–6741 (1996).
63. Neve, R. L., Boyce, F. M., McPhie, D. L., Greenan, J. & Oster-Granite, M. Lou. Transgenic mice expressing APP-C100 in the brain. *Neurobiol. Aging* **17**, 191–203 (1996).
64. Lichtenthaler, S. F. α -secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem.* **116**, 10–21 (2011).
65. Kuhn, P.-H. *et al.* ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **29**, 3020–3032 (2010).
66. Müller, T., Meyer, H. E., Egensperger, R. & Marcus, K. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-Relevance for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **85**, 393–406 (2008).
67. McLoughlin, D. M. & Miller, C. C. J. The FE65 proteins and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **86**, 744–754 (2008).
68. Edbauer, D. *et al.* Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat. Cell Biol.* **5**, 486–488 (2003).
69. Wolfe, M. S. *et al.* Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398**, 513–517 (1999).
70. LaFerla, F. M., Green, K. N. & Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509 (2007).
71. Vassar, R. *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735–741 (1999).
72. Selkoe, D. J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23–A31 (1999).
73. Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. M. & Tessier-Lavigne, M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**, 981–989 (2009).
74. Esler, W. P. & Wolfe, M. S. A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* **293**, 1449–1454 (2001).
75. Anandatheerthavarada, H. K. & Devi, L. Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuroscientist* **13**, 626–38 (2007).
76. Benveniste, E. N., Nguyen, V. T. & O'Keefe, G. M. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **39**, 381–91
77. Selkoe, D. J. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* **140**, 627–38 (2004).
78. Walker, L. C. *et al.* Apolipoprotein E4 promotes the early deposition of Abeta42 and then Abeta40 in the elderly. *Acta Neuropathol.* **100**, 36–42 (2000).
79. Kosik, K. S., Joachim, C. L. & Selkoe, D. J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4044–4048 (1986).
80. Selkoe, D. J., Ihara, Y. & Salazar, F. J. Alzheimer's disease: insolubility of partially purified paired helical filaments in sodium dodecyl sulfate and urea. *Science* **215**, 1243–1245 (1982).
81. Lee, V. M., Goedert, M. & Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1121–59 (2001).
82. Gendreau, K. L. & Hall, G. F. Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front. Neurol.* **4**, 160 (2013).
83. Wang, J.-Z., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 59–68 (2007).
84. Bramblett, G. T. *et al.* Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* **10**, 1089–99 (1993).
85. Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. & Iqbal, K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6923–8 (2001).

86. Maccioni, R. B., Muñoz, J. P. & Barbeito, L. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Arch. Med. Res.* **32**, 367–381 (2001).
87. Goedert, M. Tau protein and neurodegeneration. in *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 45–49 (2004).
88. Rock, R. B. *et al.* Role of microglia in central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 942–964, table of contents (2004).
89. Carson, M. J., Thrash, J. C. & Lo, D. Analysis of microglial gene expression: identifying targets for CNS neurodegenerative and autoimmune disease. *Am. J. Pharmacogenomics* **4**, 321–30 (2004).
90. Hanisch, U.-K. & Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* **10**, 1387–1394 (2007).
91. Chan, W. Y., Kohsaka, S. & Rezaie, P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res. Rev.* **53**, 344–54 (2007).
92. Alliot, F., Godin, I. & Pessac, B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev. Brain Res.* **117**, 145–152 (1999).
93. Imamoto, K. & Leblond, C. P. Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. II. Origin of microglial cells. *J. Comp. Neurol.* **180**, 139–63 (1978).
94. Thomas, W. E. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **17**, 61–74
95. Gehrman, J., Matsumoto, Y. & Kreutzberg, G. W. Microglia: Intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* **20**, 269–287 (1995).
96. Voyvodic, J. T. Cell death in cortical development: How much? Why? So what? *Neuron* **16**, 693–6 (1996).
97. Ling, E. A. & Wong, W. C. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7**, 9–18 (1993).
98. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314–1318 (2005).
99. Yao, J., Keri, J. E., Taffs, R. E. & Colton, C. A. Characterization of interleukin-1 production by microglia in culture. *Brain Res.* **591**, 88–93 (1992).
100. Shimojo, M., Nakajima, K., Takei, N., Hamanoue, M. & Kohsaka, S. Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia. *Neurosci. Lett.* **123**, 229–231 (1991).
101. Nakajima, K. & Kohsaka, S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J. Biochem.* **130**, 169–175 (2001).
102. Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* **91**, 461–553 (2011).
103. Inoue, K. Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* **40**, 156–63 (2002).
104. Davalos, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **8**, 752–758 (2005).
105. Fetler, L. & Amigorena, S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. *Science* **309**, 392–3 (2005).
106. Yin, X. *et al.* Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J. Neurosci.* **18**, 1953–62 (1998).
107. Town, T., Nikolich, V. & Tan, J. The microglial “activation” continuum: from innate to adaptive responses. *J. Neuroinflammation* **2**, 24 (2005).
108. Morgan, S. C., Taylor, D. L. & Pockock, J. M. Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J. Neurochem.* **90**, 89–101 (2004).
109. Liao, H., Bu, W., Wang, T.-H., Ahmed, S. & Xiao, Z.-C. Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. *J. Biol. Chem.* **280**, 8316–23 (2005).
110. Akiyama, H. *et al.* Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **21**, 383–421
111. Galea, I., Bechmann, I. & Perry, V. H. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol.* **28**, 12–8 (2007).
112. Nakamura, Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 945–53 (2002).
113. Van Rossum, D. & Hanisch, U.-K. Microglia. *Metab. Brain Dis.* **19**, 393–411 (2004).
114. Block, M. L., Zecca, L. & Hong, J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 57–69 (2007).
115. Hoek, R. M. *et al.* Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* **290**, 1768–71 (2000).
116. Cardona, A. E. *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* **9**, 917–24 (2006).
117. Kim, S. U. & de Vellis, J. Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* **81**, 302–13 (2005).
118. Marín-Teva, J. L. *et al.* Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* **41**, 535–47 (2004).

119. Stevens, B. *et al.* The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* **131**, 1164–78 (2007).
120. Napoli, I. & Neumann, H. Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* **158**, 1030–8 (2009).
121. Hanisch, U. K. *et al.* The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2104–15 (2001).
122. Häusler, K. G. *et al.* Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur. J. Neurosci.* **16**, 2113–2122 (2002).
123. Elward, K. & Gasque, P. “Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol. Immunol.* **40**, 85–94 (2003).
124. Liu, Y. *et al.* Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J. Neurosci.* **26**, 12904–13 (2006).
125. Miyanishi, M. *et al.* Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435–439 (2007).
126. Koizumi, S. *et al.* UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **446**, 1091–1095 (2007).
127. Inoue, K., Koizumi, S., Kataoka, A., Tozaki-Saitoh, H. & Tsuda, M. P2Y(6)-Evoked Microglial Phagocytosis. *Int. Rev. Neurobiol.* **85**, 159–63 (2009).
128. Fang, K.-M., Yang, C.-S., Sun, S. H. & Tzeng, S.-F. Microglial phagocytosis attenuated by short-term exposure to exogenous ATP through P2X receptor action. *J. Neurochem.* **111**, 1225–37 (2009).
129. Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R. & Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* **59**, 1169–80 (2011).
130. Chang, Y.-P., Fang, K.-M., Lee, T.-I. & Tzeng, S.-F. Regulation of microglial activities by glial cell line derived neurotrophic factor. *J. Cell. Biochem.* **97**, 501–11 (2006).
131. Mitrasinovic, O. M. & Murphy, G. M. Microglial overexpression of the M-CSF receptor augments phagocytosis of opsonized Aβeta. *Neurobiol. Aging* **24**, 807–15 (2003).
132. Webster, S. D. *et al.* Complement component C1q modulates the phagocytosis of Aβeta by microglia. *Exp. Neurol.* **161**, 127–38 (2000).
133. Dickson, D. W. *et al.* Alzheimer’s disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am. J. Pathol.* **132**, 86–101 (1988).
134. Walker, D. G. & Lue, L.-F. Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer’s disease and other neurodegenerative diseases. *J. Neurosci. Res.* **81**, 412–25 (2005).
135. Qiu, W. Q. *et al.* Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J. Biol. Chem.* **273**, 32730–32738 (1998).
136. Meyer-Luehmann, M. *et al.* Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Nature* **451**, 720–4 (2008).
137. Christie, R. H. *et al.* Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer’s disease observed by in vivo multiphoton microscopy. *J. Neurosci.* **21**, 858–64 (2001).
138. Bolmont, T. *et al.* Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J. Neurosci.* **28**, 4283–92 (2008).
139. Bard, F. *et al.* Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **6**, 916–9 (2000).
140. Rogers, J., Strohmeier, R., Kovelowski, C. J. & Li, R. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* **40**, 260–9 (2002).
141. D’Andrea, M. R., Cole, G. M. & Ard, M. D. The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol. Aging* **25**, 675–683 (2004).
142. Mandrekar, S. *et al.* Microglia mediate the clearance of soluble Aβeta through fluid phase macropinocytosis. *J. Neurosci.* **29**, 4252–62 (2009).
143. Koenigsnecht, J. & Landreth, G. Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **24**, 9838–46 (2004).
144. Takaki, Y. *et al.* Biochemical identification of the neutral endopeptidase family member responsible for the catabolism of amyloid beta peptide in the brain. *J. Biochem.* **128**, 897–902 (2000).
145. Grathwohl, S. A. *et al.* Formation and maintenance of Alzheimer’s disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat. Neurosci.* **12**, 1361–3 (2009).
146. Malm, T. M. *et al.* Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol. Dis.* **18**, 134–42 (2005).

147. Simard, A. R. & Rivest, S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* **18**, 998–1000 (2004).
148. Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.-P. & Rivest, S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* **49**, 489–502 (2006).
149. Takata, K. *et al.* Microglial transplantation increases amyloid-beta clearance in Alzheimer model rats. *FEBS Lett.* **581**, 475–8 (2007).
150. Majumdar, A. *et al.* Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1490–6 (2007).
151. Liu, B. & Hong, J.-S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 1–7 (2003).
152. Fan, R. *et al.* Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J. Neurosci.* **27**, 3057–63 (2007).
153. Coraci, I. S. *et al.* CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* **160**, 101–112 (2002).
154. Manczak, M. *et al.* Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1437–49 (2006).
155. Stoll, G., Jander, S. & Schroeter, M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. *J. Neural Transm. Suppl.* **59**, 81–9 (2000).
156. Nathan, C. *et al.* Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **202**, 1163–9 (2005).
157. El Khoury, J. & Luster, A. D. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 626–632 (2008).
158. Hickman, S. E., Allison, E. K. & El Khoury, J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* **28**, 8354–60 (2008).
159. Heiple, J. M., Wright, S. D., Allen, N. S. & Silverstein, S. C. Macrophages form circular zones of very close apposition to IgG-coated surfaces. *Cell Motil. Cytoskeleton* **15**, 260–70 (1990).
160. Manczak, M. *et al.* Neutralization of granulocyte macrophage colony-stimulating factor decreases amyloid beta 1-42 and suppresses microglial activity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 3876–3893 (2009).
161. Shaftel, S. S. *et al.* Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Invest.* **117**, 1595–604 (2007).
162. El Khoury, J. *et al.* Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* **13**, 432–8 (2007).
163. Radde, R. *et al.* Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* **7**, 940–6 (2006).
164. Moehlmann, T. *et al.* Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8025–30 (2002).
165. Yu, X. *et al.* The mtDNA nt7778 G/T polymorphism affects autoimmune diseases and reproductive performance in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4689–98 (2009).
166. Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4106–14 (2000).
167. Horvath, R. J., Nutile-McMenemy, N., Alkaitis, M. S. & DeLeo, J. A. Differential migration, LPS-induced cytokine, chemokine, and NO expression in immortalized BV-2 and HAPI cell lines and primary microglial cultures. *J. Neurochem.* **107**, 557–69 (2008).
168. Scheffler, K. *et al.* Determination of spatial and temporal distribution of microglia by 230nm-high-resolution, high-throughput automated analysis reveals different amyloid plaque populations in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **8**, 781–8 (2011).
169. Yu, X. *et al.* Dissecting the effects of mtDNA variations on complex traits using mouse conplastic strains. *Genome Res.* **19**, 159–165 (2009).
170. Hsiao, K. K. *et al.* Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* **15**, 1203–18 (1995).
171. Fröhlich, C. *et al.* Genomic background-related activation of microglia and reduced β -amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. **3**, 21–27 (2013).

172. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–95 (2006).
173. Scheffler, K. *et al.* Mitochondrial DNA polymorphisms specifically modify cerebral β -amyloid proteostasis. *Acta Neuropathol.* **124**, 199–208 (2012).
174. Wyss-Coray, T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat. Med.* **12**, 1005–1015 (2006).
175. Schenk, D. B. & Yednock, T. The role of microglia in Alzheimer's disease: friend or foe? *Neurobiol. Aging* **23**, 677–9; discussion 683–4
176. Simard, A. R. & Rivest, S. Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* **11**, 327–35 (2006).
177. Streit, W. J. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **48**, 234–9 (2005).
178. Mrak, R. E. & Griffin, W. S. T. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* **26**, 349–54 (2005).
179. El Khoury, J. B. *et al.* CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J. Exp. Med.* **197**, 1657–66 (2003).
180. Zipp, F. & Aktas, O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* **29**, 518–27 (2006).
181. Dieterich, D. T., Kim, M. H., McMeeding, A. & Rotterdam, H. Cytomegalovirus appendicitis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Gastroenterol.* **86**, 904–6 (1991).
182. Richard, K. L., Filali, M., Préfontaine, P. & Rivest, S. Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid beta 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **28**, 5784–93 (2008).
183. Lee, S. *et al.* CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am. J. Pathol.* **177**, 2549–62 (2010).
184. Bondolfi, L. *et al.* Amyloid-Associated Neuron Loss and Gliogenesis in the Neocortex of Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **22**, 515–522 (2002).
185. Jimenez, S. *et al.* Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J. Neurosci.* **28**, 11650–61 (2008).
186. Sellers, R. S., Clifford, C. B., Treuting, P. M. & Brayton, C. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet. Pathol.* **49**, 32–43 (2012).
187. Cudaback, E., Li, X., Montine, K. S., Montine, T. J. & Keene, C. D. Apolipoprotein E isoform-dependent microglia migration. *FASEB J.* **25**, 2082–91 (2011).
188. Stozicka, Z. *et al.* Genetic background modifies neurodegeneration and neuroinflammation driven by misfolded human tau protein in rat model of tauopathy: implication for immunomodulatory approach to Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **7**, 64 (2010).
189. Haluzik, M. *et al.* Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice. *Endocrinology* **145**, 3258–64 (2004).
190. Graber, D. J., Harris, B. T. & Hickey, W. F. Strain-dependent variation in the early transcriptional response to CNS injury using a cortical explant system. *J. Neuroinflammation* **8**, 122 (2011).
191. Ito, S. *et al.* Amyloid-beta peptides induce cell proliferation and macrophage colony-stimulating factor expression via the PI3-kinase/Akt pathway in cultured Ra2 microglial cells. *FEBS Lett.* **579**, 1995–2000 (2005).
192. Lehman, E. J. H. *et al.* Genetic background regulates beta-amyloid precursor protein processing and beta-amyloid deposition in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2949–2956 (2003).
193. Dong, S. M. *et al.* Epigenetic inactivation of RASSF1A in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3635–40 (2003).
194. Sebastiani, G. *et al.* Mapping genetic modulators of amyloid plaque deposition in TgCRND8 transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2313–23 (2006).
195. Glazner, K. A. C. *et al.* Strain specific differences in memory and neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Life Sci.* **86**, 942–950 (2010).
196. Song, M. *et al.* TLR4 mutation reduces microglial activation, increases A β deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* **8**, 92 (2011).
197. Hofrichter, J. *et al.* Reduced Alzheimer's disease pathology by St. John's Wort treatment is independent of hyperforin and facilitated by ABCC1 and microglia activation in mice. *Curr. Alzheimer Res.* **10**, 1057–69 (2013).
198. Inoue, K. The function of microglia through purinergic receptors: neuropathic pain and cytokine release. *Pharmacol. Ther.* **109**, 210–26 (2006).

199. Verderio, C. & Matteoli, M. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J. Immunol.* **166**, 6383–6391 (2001).
200. Ogata, T. *et al.* Adenosine triphosphate inhibits cytokine release from lipopolysaccharide-activated microglia via P2y receptors. *Brain Res.* **981**, 174–183 (2003).
201. Chopp, M. & Li, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* **1**, 92–100 (2002).
202. Priller, J. *et al.* Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat. Med.* **7**, 1356–1361 (2001).
203. Vallières, L. & Sawchenko, P. E. Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *J. Neurosci.* **23**, 5197–5207 (2003).
204. Stalder, A. K. *et al.* Invasion of hematopoietic cells into the brain of amyloid precursor protein transgenic mice. *J. Neurosci.* **25**, 11125–11132 (2005).
205. Haynes, S. E. *et al.* The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* **9**, 1512–1519 (2006).
206. Ohsawa, K. *et al.* P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia* **58**, 790–801 (2010).
208. Die Alzheimer'sche Erkrankung – Neuropathologie und Neurobiologie von Christian Bernreuther und Markus Glatze. (2006)
209. Pahnke J. Könnte es Alzheimer sein? Artikel aus „traditio et innovatio“ - Forschungsmagazin Der Universität Rostock (Juni 2008)
210. www.deutsche-alzheimer.de
211. Alzheimer's Disease International 2009
212. Wegiel, J. & Wisniewski, H. M. The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction. *Acta Neuropathol.* **81**, 116–24 (1990).
213. Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S. & Selkoe, D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Neuroimmunol.* **24**, 173–82 (1989).
214. Naert, G. & Rivest, S. CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **31**, 6208–20 (2011).
215. Bondolfi, L. *et al.* Amyloid-Associated Neuron Loss and Gliogenesis in the Neocortex of Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *J. Neurosci.* **22**, 515–522 (2002).
216. Charo, I. F. & Peters, W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation* **10**, 259–64 (2003).

7. Erklärung

nach §4 Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock.

Ich versichere hiermit an Eides statt, das ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Göttingen, den 23.07.2014

Jan Stenzel

8. Publikationen

Fröhlich C*, Paarmann K*, Steffen J*, **Stenzel J***, Krohn M, Heinze HJ, Pahnke J.: Genomic background-related activation of microglia and reduced β - amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Microbiol Immunol*, (2013) 1, pp. 21–27

Schumacher T, Krohn M, Hofrichter J, Lange C, **Stenzel J**, Steffen J, Dunkelmann T, Paarmann K, Fröhlich C, Uecker A, Plath AS, Sommer A, Brüning T, Heinze HJ, Pahnke J.: ABC transporters B1, C1 and G2 differentially regulate neuroregeneration in mice. *PLoS One*. 2012;7(4)e35613

Scheffler K, Krohn M, Dunkelmann T, **Stenzel J**, Miroux B, Ibrahim S, von Bohlen und Halbach O, Heinze HJ, Walker L, Gsponer JA Pahnke J.: Mitochondrial DNA polymorphism specially modify cerebral β -amyloid proteolysis. *Acta Neuropathol*. 2012 Aug;124(2):199-208

Krohn M, Lange C, Hofrichter J, Scheffler K, **Stenzel J**, Steffen J, Schumacher T, Brüning T, Plath AS, Alfen F, Schmidt A, Winter F, Rateitschak K, Wree A, Gsponer J, Walker LC, Pahnke J.: Cerebral amyloid- β proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice. *J Clin Invest*. 2011 Oct 3;121(10):3924-31.

Scheffler K*, **Stenzel J***, Krohn M, Lange C, Hofrichter J, Schumacher T, Brüning T, Plath AS, Walker L, Pahnke J.: Determination of Spatial and Temporal Distribution of Microglia by 230nm-High-Resolution, High-Throughput Automated Analysis Reveals Different Amyloid Plaque Populations in an APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2011 Jan 19. PMID: 21244350

* Arbeit zu gleichen Teilen

9. Lebenslauf