

**Expression der Glutaminylzyklase in Gliazellen
nach Schädigung von Hirngewebe**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Julia Brune
geboren am 23.05.1986 in Hemer

angefertigt am: Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Steffen Roßner

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einführung	8
1.1 Morbus Alzheimer	8
1.2 Histopathologie der Alzheimerschen Erkrankung	10
1.2.1 Degeneration cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns.....	11
1.2.2 Entstehung von Amyloid- β und Amyloid-Plaques.....	12
1.2.3 Bedeutung der QC für die Entstehung der Alzheimer-Demenz	14
1.3 Aktivierung von Gliazellen unter pathologischen Bedingungen	16
1.3.1 Aktivierung von Mikroglia.....	16
1.3.2 Aktivierung von Astrozyten.....	19
1.4 QC-Expression in Gliazellen – eine mögliche Brücke zwischen Inflammation und Neurodegeneration?	23
2 Aufgabenstellung	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Schädigungsmodell mit Verlust cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns.....	25
3.1.1 Versuchstiere	25
3.1.2 Stereotaktische Mikroinjektion von 192-IgG-SAP	25
3.1.3 Das Immunotoxin: 192-IgG-SAP	26
3.1.4 Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie	27

3.2	Schädigungsmodell der fokalen Ischämie durch transiente Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO)	27
3.2.1	Versuchstiere	27
3.2.2	Induktion fokaler Ischämie durch 30 min MCAO	28
3.2.3	Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie	28
3.3	Immunhistochemische Untersuchungen.....	29
3.3.1	Visualisierung mit DAB	29
3.3.2	Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz.....	30
3.4	Mikroskopie	31
3.4.1	Lichtmikroskopie.....	31
3.4.2	Konfokale Laserscanningmikroskopie	31
3.4.3	Quantifizierung der cholinergen Zellen	31
4	Ergebnisse	33
4.1	Immunoläsion cholinergener Neurone.....	33
4.1.1	Neuronenverlust in cholinergen Gebieten des basalen Vorderhirns.....	33
4.1.2	Astrozytenaktivierung nach Immunoläsion mit 192-IgG-SAP	36
4.1.3	Mikrogliaaktivierung nach Immunoläsion mit 192-IgG-SAP	39
4.1.4	Bildung einer typischen Glianarbe als Reaktion auf Neuronenschädigung .	42
4.1.5	QC-Darstellung in lichtmikroskopischen Aufnahmen.....	43
4.1.6	QC-Expression in Astrozyten und Mikroglia	44
4.2	Ischämie durch Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO)	47
4.2.1	Untersuchung des Striatums zwei Tage nach Okklusion der ACM	48
4.2.2	Untersuchung des Striatums sieben Tage nach Okklusion der ACM	50
4.2.1	Untersuchung des Hippocampus zwei Tage nach Okklusion der ACM.....	52
4.2.2	Untersuchung des Hippocampus sieben Tage nach Okklusion der ACM ...	54
4.2.3	QC-Expression in Astrozyten bzw. Mikroglia und Ko-Expression von QC mit HSP 27	56
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der QC-Expression in Gliazellen	60

5	Diskussion	61
5.1	Methodische Betrachtungen.....	62
5.2	Auswirkungen der cholinergen Immunoläsion	64
5.3	Auswirkungen der transienten Ischämie.....	67
5.3.1	Demenzielle Entwicklung nach Schlaganfall	70
5.4	Ausblick dieser Arbeit.....	72
6	Zusammenfassung der Arbeit	73
	Literaturverzeichnis	76
	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	84
	Lebenslauf	85
	Danksagung.....	86

Bibliographische Beschreibung

Brune, Julia

Expression der Glutaminylyklase in Gliazellen nach Schädigung von Hirngewebe

Universität Leipzig, Dissertation

86 Seiten, 108 Literaturverweise, 15 Abbildungen, 2 Tabellen

Referat:

Die Alzheimer-Demenz drängt immer mehr in den Fokus unserer Gesellschaft, doch ihre Pathophysiologie ist bisher nicht vollständig verstanden. Seit einigen Jahren ist das Enzym Glutaminylyklase (QC) als wichtiger Katalysator der Bildung von Pyroglutamat- β -Amyloid Inhalt intensiver Forschung. Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Expression der QC, welche bisher nur in Neuronen nachgewiesen wurde, in Astrozyten und Mikrogliazellen zu untersuchen. Da Gliazellen einen wichtigen Faktor der pathologischen Veränderungen neurodegenerativer Erkrankungen ausmachen, stellt sich die Frage nach ihrer kausalen Beteiligung an Prozessen, die zur Entstehung der Alzheimer-Demenz beitragen können.

Für diese Studie wurden zwei Modelle gewählt, die zu einer spezifischen Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen als Reaktion auf eine Schädigung von Neuronen führten, zum einen nach Schädigung cholinergischer Neurone durch das Neurotoxin 192-IgG-Saporin, zum anderen nach temporärer Okklusion der Arteria cerebri media. Die aktivierten Astrozyten zeigten eine deutliche Expression der QC, welche hingegen bei ruhenden Astrozyten im gesunden Gewebe nicht nachweisbar war, so dass von einer Hochregulation der Expression bei Aktivierung der Zellen ausgegangen werden kann. Weiterhin konnte die QC in Mikrogliazellen, die sich im phagozytierenden Stadium befinden, dargestellt werden.

Diese Arbeit soll dazu beitragen die Zusammenhänge zwischen einer Aktivierung von Gliazellen nach einem Schädigungsereignis, wie zum Beispiel einer Ischämie bei Verschluss eines cerebralen Gefäßes, und der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz aufzuklären.

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β
ACI	Arteria carotis interna
ACM	Arteria cerebri media
AComP	Arteria communicans posterior
AD	Alzheimer-Demenz
AP	anterior posterior
APP	Amyloid precursor protein = Amyloid-Vorläuferprotein
BACE-1	β -site of APP cleaving enzyme = β -Sekretase
BSA	Rinderserum-Albumin
CA	Cornu ammonis = Ammonshorn
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
CD	Cluster of Differentiation
Cy	Carbocyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DV	dorso-ventral
ENS	Eselnormalserum
EWN	Edinger-Westphal-Kern
GABA	γ -Aminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus
GDgr	Stratum granulare des Gyrus dentatus
GDmol	Stratum moleculare des Gyrus dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein = saures Gliafaserprotein
GNS	Ziegennormalserum
GP	Globus pallidus
GSA	Griffonia Simplicifolia
H	Hilus des Gyrus dentatus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDB	horizontales Diagonalband
HSP	Hitzeschock-Protein
Iba-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IgG	Immunglobulin γ
IL	Interleukin

ipsi	ipsilateral
kontra	kontralateral
LC	Locus coeruleus
MCAO	middle cerebral artery occlusion = Okklusion der Arteria cerebri media
MCI	Mild Cognitive Impairment
MHC	Major Histocompatibility Complex = Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
MS	mediales Septum
N-Terminus	Amino-Terminus
N ₂ O	Distickstoffmonoxid
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaN ₃	Natriumazid
Ni-DAB	Nickel-3,3'-Diaminobenzidine
NBM	Nucleus basalis Meynert (Mensch)
Nbm	Nucleus basalis magnocellularis (Ratte)
NO	Stickstoffmonoxid
NTR	Neurotropinrezeptor
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pE-A β	Pyroglutamat- β -Amyloid-Protein
QC	Glutaminylyklase
S	Striatum
SA-HRP	Streptavidin-Meerrettichperoxidase
SAP	Saporin
TBS	Tris-gepuffertes Kochsalz
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Ucn-1	Urocortin-1
VDB	vertikales Diagonalband
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ChAT-Immunhistochemie: Verlust cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn.	34
Abbildung 2: Verlust cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn (Graphik).....	35
Abbildung 3: GFAP-Immunhistochemie: Astrozytenaktivierung im basalen Vorderhirn..	37
Abbildung 4: GFAP-Immunhistochemie: Astrozytenaktivierung im Hippocampus..	38
Abbildung 5: bio-GSA-Lektin-Histochemie: Mikrogliaaktivierung im basalen Vorderhirn	40
Abbildung 6: bio-GSA-Lektin-Histochemie: Mikroglia Darstellung im Hippocampus.....	41
Abbildung 7: Bildung einer Glianarbe nach Injektion von 192-IgG-SAP am Beispiel des Nbm.....	42
Abbildung 8: QC-Immunhistochemie: QC-Expression in Nbm und Hippocampus	43
Abbildung 9: QC-Expression in Astrozyten und Mikrogliazellen.....	46
Abbildung 10: Striatum ipsilateral, 2 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM.....	49
Abbildung 11: Striatum ipsilateral, 7 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM.....	51
Abbildung 12: Hippocampus ipsilateral, 2 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM.....	53
Abbildung 13: Hippocampus ipsilateral, 7 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM.....	55
Abbildung 14: Doppelmarkierung von QC und Gliazellen: Striatum ipsilateral, 7 Tage nach Okklusion der ACM.....	57
Abbildung 15: Doppelmarkierung von QC und Gliazellen: Hippocampus ipsilateral, 7 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der durchgeführten Immunhistochemischen Untersuchungen und verwendete Antikörper.....	32
Tabelle 2 Ergebnisse der Doppelmarkierungen von QC mit Astrozyten- und Mikroglia markern	60

1 Einführung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Expression des potentiell pathologischen Enzyms Glutaminylzyklase (QC) bei der Entstehung der Alzheimer-Demenz und dessen Induktion in aktivierten Gliazellen nach einem Schädigungsereignis. Dazu wurde ein Modell des cholinergen Zellverlusts in Ratten und eines der Ischämie in Mäusen untersucht.

1.1 Morbus Alzheimer

Der Morbus Alzheimer, die häufigste Ursache dementieller Veränderungen des älteren Menschen mit weltweit mehr als 35 Millionen Betroffenen stellt eine der großen Herausforderungen für die Gesundheitssysteme und die Hirnforschung dar (Medeiros & LaFerla 2013). Die Krankheit ist gekennzeichnet durch progredienten Verlust kognitiver Fähigkeiten und bedingt im Endstadium eine vollständige Abhängigkeit von Außenstehenden, bis sie durchschnittlich 9 Jahre nach Diagnosestellung zum Tod führt (Medeiros & LaFerla 2013). Obwohl bereits viele molekulare Pathomechanismen bekannt sind, sind die genaue Ätiologie und die Zusammenhänge der pathologischen Veränderungen weiterhin Inhalt intensiver Forschung (Streit 2004).

Der Morbus Alzheimer ist gekennzeichnet durch Ablagerungen von fehlgefalteten Amyloid β -Proteinen ($A\beta$) in extrazellulären Amyloid-Plaques und von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen in intrazellulären Neurofibrillenbündeln (Braak & Braak 1991), sowie einer starken Gliaaktivierung (Nagele et al. 2004) und Untergang cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns (Whitehouse et al. 1982; Coyle, Price & DeLong 1983; Schliebs & Arendt 2006). Diese Neurone sind maßgeblich an den Hirnleistungen Gedächtnis und Lernen beteiligt (Deutsch 1971; Schliebs & Arendt 2006).

Anhand des anatomischen Vorkommens der Neurone mit Neurofibrillenbündeln ist eine Stadieneinteilung von I-VI nach Braak möglich, die das kontinuierliche Voranschreiten der neurodegenerativen Erkrankung verdeutlicht (Braak & Braak 1991). Jedem Stadium ist ein spezifisches, progressives Verteilungsmuster der Neurofibrillenbündel zuzuordnen, während die Morphologie und Verteilung von

Amyloid-Plaques sehr individuell und nicht für eine Stadieneinteilung geeignet ist (Braak & Braak 1991).

Beim Mild Cognitive Impairment (MCI), das durch eine leicht nachlassende kognitive Leistung bei erhaltener Fähigkeit zur Bewältigung alltäglicher Fertigkeiten gekennzeichnet ist und einen prädisponierenden Faktor für die Alzheimer-Erkrankung darstellt, können bereits im Vergleich zu Kontrollen vermehrt Neurofibrillenbündel, A β -Ablagerungen und Neuronenverlust in typischen Hirnregionen gefunden werden (Masters et al. 2006). Es wird vermutet, dass A β -Ablagerungen an der frühen Pathogenese der Alzheimer-Demenz (AD) beteiligt sind und die Ausbreitung von Neurofibrillen im Gegensatz zu physiologischen Altersprozessen vorantreiben (Morris & Price 2001). Es besteht die Theorie, dass A β -Plaques- und Neurofibrillen-Akkumulation bereits 10-15 Jahre voranschreiten, bevor sich der begleitende Neuronen- und Synapsenuntergang mit Entwicklung dementieller Symptome manifestiert (Perrin, Fagan & Holtzman 2009).

Es sind sporadische und familiäre Formen der Alzheimer Erkrankung bekannt, wobei die familiären Alzheimer-Fälle weniger als 10% ausmachen (Saido 1998). Mutationen im Gen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP = amyloid precursor protein) und den Presenilin-1- und Presenilin-2-Genen, welche Untereinheiten des γ -Sekretase-Komplexes kodieren, sind mit einem familiären Auftreten der Erkrankung in jüngeren Jahren (early onset AD) assoziiert, während das Risiko einer Alzheimer-Erkrankung in älteren Jahren (late onset AD) bei Patienten mit Apolipoprotein E- ϵ 4-Genotyp auf das 4-fache erhöht ist (Bertram, Lill & Tanzi 2010). Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko für die Alzheimersche Erkrankung bei Patienten mit Trisomie 21 durch eine zusätzliche Kopie des APP-Gens auf Chromosom 21q (Bertram, Lill & Tanzi 2010).

Da bei den familiären Formen der Alzheimer-Erkrankung Gene betroffen sind, die zur Entstehung von A β -Proteinen beitragen, wird die „Amyloid Hypothese“ (Hardy & Higgins 1992) gestützt, die besagt, dass in der A β -Aggregation der Ursprung der Erkrankung liegt, während Tau-Ablagerung, Inflammation und Neuronenuntergang nur dessen Folge sind (Saido 1998; Bertram, Lill & Tanzi 2010). Es wird angenommen, dass ein Zusammenwirken von Tau- und A β -Pathologie in der frühen AD-Pathogenese auftritt, wie kürzlich von Ke et. al. zusammengefasst wurde (Ke et al. 2012). Diese Theorie wird unterstützt durch Studien, die in vivo eine verminderte

Toxizität von A β bei Tau-Knockout-Mäusen zeigten (Roberson et al. 2007; Nussbaum et al. 2012).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse bestehen intensive Bemühungen, Frühmarker der Alzheimerschen Erkrankung im präklinischen Intervall zu erkennen und möglichst eine präventive Therapie einzuleiten. Neue Untersuchungsmethoden mit spezifischen Amyloid-Markern z.B. Pittsburgh Compound-B-Positronen-Emissions-Tomographie (PIB-PET), funktionelle Magnetresonanztomographie-Scans oder die Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET), zusammen mit bewährten Methoden wie Messung von A β 1-42 und phosphoryliertem Tau-Protein im Liquor sollen in Zukunft helfen, eine Diagnostik der Erkrankung vor Eintreten dementieller Symptome zu ermöglichen (Perrin, Fagan & Holtzman 2009).

1.2 Histopathologie der Alzheimerschen Erkrankung

Gekennzeichnet ist die Pathologie des Morbus Alzheimer durch Neuronenuntergang (Ballatore, Lee & Trojanowski 2007), Hyperphosphorylierung von Tau und Tau-Fragmenten und daraus resultierender Bildung von Neurofibrillen (Braak & Braak 1991; Goedert & Spillantini 2011), Ablagerung von A β in Amyloid-Plaques (senile Plaques) und Gefäßwänden sowie einer Aktivierung von Gliazellen (Heneka, Rodríguez & Verkhratsky 2010; Wong et al. 2012). Verschiedene Neurotransmitter-Systeme des Gehirns sind bei der Erkrankung betroffen, vor allem in Regionen die wichtig für Lernen, Gedächtnis und kognitive Prozesse sind. Dazu zählen das cholinerge System des basalen Vorderhirns, Neurone des Hirnstamms, des Hippocampus, des entorhinalen Cortex, des limbischen Cortex und des Neocortex (Wong et al. 2012).

Die Ätiologie der Alzheimerschen Erkrankung ist noch nicht vollständig geklärt, die anerkannteste Theorie ist jedoch die „Amyloid-Kaskaden Hypothese“ (Hardy & Higgins 1992). Sie besagt, dass durch ein Ungleichgewicht von A β -Produktion und -Abbau eine Akkumulation von A β -Proteinen eingeleitet wird, die eine Kaskade von Pathomechanismen initiiert. Dazu zählen Gliose, Inflammation, Exzitotoxizität, Tau-Fibrillen-Bildung, oxidativer Stress, Synapsenfehlfunktion und Neuronendegeneration, die letztendlich zur dementiellen Entwicklung führen

(Fodero-Tavoletti et al. 2011; Masters et al. 2006). Während A β die Alzheimer-Pathologie zu initiieren scheint, korreliert die Anwesenheit von Tau-Aggregaten, welche zuerst im transentorhinalen Cortex, später im Hippocampus und dem Neocortex zu finden sind, stärker mit dem Auftreten kognitiver Defizite (Braak & Braak 1991; Wong et al. 2012).

1.2.1 Degeneration cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns

Für eine Versuchsreihe dieser Arbeit wurde das cholinerge System des basalen Vorderhirns betrachtet, da es von der Alzheimer-Pathologie betroffen ist (Schliebs & Arendt 2006). Acetylcholin ist im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet und an vielen neuronalen Abläufen beteiligt, z.B. an den Funktionen Lernen und Gedächtnis (Schliebs & Arendt 2006). Die cholinergen Neurone des basalen Vorderhirns, welche das mediale Septum, das horizontale und vertikale Diagonalband von Broca und den Nucleus Basalis Meynert umfassen, stellen die cholinergen Hauptprojektionen zum Hippocampus und Cortex dar (Schliebs & Arendt 2011). Im Zuge der normalen Altersprozesse kommt es zu einer milden Degeneration cholinergischer Neurone, einhergehend mit den physiologisch auftretenden Gedächtnisdefiziten im höheren Lebensalter (Bartus et al. 1982; Schliebs & Arendt 2006).

Bei Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung zeigen viele Studien jedoch im Vergleich zu gesunden Probanden eine stärkere Reduktion cholinergischer Marker (z.B. Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT) oder Acetylcholin-Esterase (AChE) im Cortex, welche mit der Entwicklung kognitiver Defizite korreliert (Davies & Maloney 1976; Perry et al. 1978). Bereits zu Beginn der 80er-Jahre beschrieben verschiedene Arbeitsgruppen eine erhebliche Reduktion cholinergischer Neurone im Nucleus basalis Meynert (Arendt et al. 1985) mit Verringerung präsynaptischer Marker in ihrem Projektionsgebiet im Cortex bei Alzheimer-Patienten (Whitehouse et al. 1982). 1984 zeigten Hyman et al. spezifische Verteilungsmuster von Neurofibrillen und Neuronenschädigung im Hippocampus sowie den Schichten II und IV des entorhinalen Cortex bei Alzheimer-Patienten, Regionen die an der Ausbildung neuronaler Netzwerke für die Gedächtnisfunktion beteiligt sind (Hyman et al. 1984).

1.2.2 Entstehung von Amyloid- β und Amyloid-Plaques

Amyloid-Plaques bestehen zu großen Teilen aus extrazellulären Ablagerungen von A β , welches auch bei gesunden älteren Individuen im Hirnparenchym und im Liquor zu finden ist (Sjogren et al. 2001; Fodero-Tavoletti et al. 2011), sowie geschwollenen Neuriten, reaktiven Astrozyten und Mikroglia (Nagele et al. 2004). Es werden „diffuse“, „unreife“ und „reife, neuritische“ Plaques unterschieden, wobei diffuse Plaques die Vorläufer der neuritischen Plaques zu sein scheinen (Iwatsubo et al. 1994).

Zu der Entstehung von A β -Aggregationen im Gehirn von Alzheimer-Patienten gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum Beispiel wird vermutet, dass die Produktion von A β im gleichen Maße bei gesund alternden Probanden und Alzheimer-Patienten stattfindet, der Abbau des Proteins bei Erkrankten im Vergleich zu Kontrollen jedoch verlangsamt ist, so dass es zu einer Aggregation des überschüssigen A β kommt (Mawuenyega et al. 2010). Eine andere Theorie besagt, dass es bei Alzheimer-Patienten durch Hochregulation der β -Sekretase (β -site of APP cleaving enzyme = BACE-1) zu einer vermehrten Produktion von A β kommt, wie 2006 zusammengefasst wurde (Rossner et al. 2006). Bisher ist nicht geklärt, ob die Pathologie durch eine gesteigerte Bildung von A β oder durch einen gestörten Abbau der fehlgefalteten Proteine begründet ist, oder ob beide Mechanismen zu der Krankheitsentstehung beitragen.

Aus dem APP, welches in der Zellmembran verankert ist, werden sequentiell zunächst durch eine β -Sekretase (BACE-1) am N-Terminus und anschließend durch die γ -Sekretase (ein Multienzym-Komplex aus Presenilin1, Presenilin2, anterior pharynx-defective 1, Präsenilin-Enhancer 2 und Nicastrin) am C-Terminus, verschiedene A β -Peptide generiert (Masters et al. 2006). Diese weisen eine Länge von 40 Aminosäuren (A β 1-40) bzw. 42 Aminosäuren (A β 1-42) auf, wobei das A β 1-42 eine höhere Tendenz zur Aggregation zeigt (Iwatsubo et al. 1994; Fodero-Tavoletti et al. 2011).

Es wurde nachgewiesen, dass sich die A β -Monomere zunächst zu löslichen Oligomeren zusammenschließen, bevor es zur A β -Fibrillenbildung und schließlich zur Formierung von unlöslichen A β -Plaques kommt (Fodero-Tavoletti et al. 2011).

Während die A β -Plaques das typische pathologische Bild der Alzheimer-Erkrankung darstellen, korreliert das Vorkommen löslicher A β -Oligomere besser mit dem Ausmaß der Neurodegeneration, der Dichte von Neurofibrillenbündeln und der dementiellen Entwicklung der Patienten, obwohl sie nur etwa 1% am Gesamt-A β bei der Alzheimer-Pathologie ausmachen (McLean et al. 1999).

Neben den A β -Peptiden, die mit Aspartat am Amino-Terminus (N-Terminus) beginnen, wurden auch eine Reihe von A β -Peptiden bei Alzheimer-Patienten gefunden, welche am N-Terminus um 2 oder 10 Aminosäuren verkürzt sind, die sogenannten N-trunkierten A β -Peptide (Saido et al. 1995; Wirths et al. 2009). Durch anschließende Zyklisierung des endständigen Glutamats durch die QC entstehen Pyroglutamat- β -Amyloid-Proteine (pE3-A β und pE11-A β) (Schilling et al. 2004; Schilling et al. 2008a). Besonders das A $\beta_{3(pE)-40/42}$ findet sich früh in senilen Plaques und neigt stärker als andere A β -Formen zur Aggregation (He & Barrow 1999; Schilling et al. 2006). Daher besteht die Vermutung, dass A $\beta_{3(pE)-40/42}$ eine kritische Rolle in der frühen Alzheimer-Pathologie spielt (He & Barrow 1999; Schilling et al. 2006). Es ist stabiler gegenüber Abbauvorgängen (Saido 1998), übt eine höhere Toxizität auf Neurone und Astrozyten in Zellkulturen aus und verursacht einen stärkeren neuronalen Zelluntergang und eine vermehrte Astrozytenaktivierung bei transgenen Mäusen als längere A β -Peptide (Russo et al. 2002; Wirths et al. 2009; Nussbaum et al. 2012).

Die pE-A β -Peptide wirken als Aggregationskern und beschleunigen in vitro die Oligomerisierung anderer nicht-modifizierter A β -Peptide (Schilling et al. 2006), weshalb eine „Prion-ähnliche“ Wirkung angenommen wird (Nussbaum et al. 2012). Es wird daher vermutet, dass pE-A β -Peptide die Plaquebildung initiieren, indem sie die Aggregation anderer A β -Formen anregen (Schilling et al. 2006).

In einer Studie mit transgenen Mäusen wurde in vivo gezeigt, dass ein deutlicher Neuronenverlust und eine Aktivierung von Astrozyten mit intraneuronalen A $\beta_{3(pE)-42}$ -Aggregaten im Hippocampus assoziiert sind. Diese Folgen traten jedoch nur in Anwesenheit des Tau-Proteins auf, während Tau-Knock-out-Mäuse keine der genannten Effekte aufwiesen (Nussbaum et al. 2012). Weiterhin zeigten Tau-Knock-out-Neurone in vitro keinen Neuronenuntergang, wenn sie mit einer Mischung aus 5% A $\beta_{3(pE)-42}$ und 95% A β_{1-42} inkubiert wurden, wohingegen diese Mischung auf Wildtyp-Neurone äußerst toxisch wirkte (Nussbaum et al. 2012). In dieser

Versuchsreihe wurde gezeigt, dass bereits ein sehr kleiner Anteil von pE-A β am Gesamt-A β eine enorme Auswirkung auf die Pathologie haben kann und dass die pathologischen Vorgänge wahrscheinlich von pE-A β initiiert werden und an Tau-Proteine geknüpft sind (Nussbaum et al. 2012).

1.2.3 Bedeutung der QC für die Entstehung der Alzheimer-Demenz

Die QC ist ein seit langem bekanntes Enzym, das die pE-Modifikation von Peptidhormonen wie Orexin A, Gastrin, Gonadotropin- und Thyreotropin-Releasing-Hormon im Hypothalamus katalysiert (Busby, WH Jr. et al. 1987; Hartlage-Rübsamen et al. 2011). In den letzten Jahren wurde weiterhin *in vitro* (Cynis et al. 2008) und *in vivo* (Schilling et al. 2008a) nachgewiesen, dass die QC das Enzym ist, welches die Zyklisierung N-trunkierter A β -Proteine zu pE-A β katalysiert. Bei Patienten mit Morbus Alzheimer ist die QC-Expression im Vergleich zu nicht dementen Kontrollen hochreguliert (Schilling et al. 2008b). Weiterhin konnte A $\beta_{3(pE)-42}$ bei Alzheimer-Patienten in hoher Konzentration, bei Gesunden jedoch nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (He & Barrow 1999; Schilling et al. 2008b).

Eine Expression der QC wurde im Hippocampus von Wildtyp-Mäusen in GABAergen Interneuronen in der Molekularschicht und im Hilus des Gyrus dentatus, sowie im Stratum radiatum und Stratum oriens des Ammonshorns beschrieben. Weiterhin wurde das Enzym in der gleichen Versuchsreihe im Hypothalamus und in kleinen Interneuronen aller Schichten des Neocortex (<1% der Gesamt-Neurone) dargestellt (Hartlage-Rübsamen et al. 2009).

Eine andere Studie erbrachte den Nachweis von QC bei Wildtyp-Mäusen in Urocortin-1-(Ucn-1) positiven Neuronen des Edinger Westphal Kerns (EWN), in noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus (LC), sowie in ca. 50% der cholinergen Neurone des Nucleus basalis Meynert (NBM) (Morawski et al. 2010). Bei einer Untersuchung von menschlichem Gewebe wurde QC im Bereich der Ucn-1-positiven und der cholinergen Neurone im EWN, sowie in noradrenergen Neuronen des LC gefunden und es zeigte sich eine Expression in fast allen cholinergen Neuronen des NBM (Morawski et al. 2010).

Bei einer Untersuchung von pE-A β -Aggregaten in den oben genannten Kerngebieten zeigten sich bei AD-Patienten im Gegensatz zu den gesunden Probanden in allen

untersuchten Regionen pE-A β -Aggregate und intrazellulär akkumuliertes pE-A β (Morawski et al. 2010). Im NBM korrelierte die höchste Dichte an QC-exprimierenden Neuronen mit der größten pE-A β -Last und dem stärksten Neuronenverlust. Da QC in den Kerngebieten auch bei Gesunden, jedoch ohne die Bildung von pE-A β nachgewiesen wurde, scheint die QC eine bisher unbekannte physiologische Funktion zu haben, die bei Gesunden nicht zur Neuronendegeneration führt (Morawski et al. 2010).

Im Hippocampus wurden zwei verschiedene Arten von A $\beta_{3(pE)-42}$ -positiven Plaques gefunden. Zum einen die fokalen Plaques, welche häufig mit einem QC-positiven Neuron assoziiert sind und zum anderen diffuse A $\beta_{3(pE)-42}$ -Ablagerungen ohne QC-Assoziation. Bei letzteren wird vermutet, dass QC oder A $\beta_{3(pE)-42}$ via axonalem Transport zum Projektionsgebiet gelangt, z.B. vom entorhinalen Cortex zum Gyrus dentatus. Bei beiden Plaquearten stellte sich A $\beta_{3(pE)-42}$ im Inneren der Ablagerung und nicht-trunkiertes A β außen dar, was für die Theorie des Aggregationskerns spricht. Plaques ohne pE-A β -Proteine wurden nicht gefunden (Hartlage-Rübsamen et al. 2011).

Der spezifische QC-Inhibitor PBD150 verringerte die Bildung von A $\beta_{3(pE)-42}$ in vitro in Zellkulturen mit APP und QC-Ko-Expression (Cynis et al. 2008), sowie in vivo bei transgenen Mäusen (Schilling et al. 2008b). Bei dauerhafter Behandlung der Mäuse zeigte sich eine deutliche Plaque-Reduktion, verringerte Mikroglia- und Astrozytenaktivierung in der Umgebung von Plaques und das episodische Gedächtnis der Versuchstiere war im Vergleich zu Kontrollen ohne PBD150-Behandlung verbessert (Schilling et al. 2008b). A β_{pE3-42} machte bei den untersuchten Tieren nur etwa 0,5% des Gesamt-A β aus, aber die Konzentration von A β_{x-40} und A β_{x-42} war ebenfalls verringert, was für die Theorie spricht, dass pE-A β als Aggregationskern für andere Amyloid-Proteine wirkt und sie so dem proteolytischen Abbau entzieht (Schilling et al. 2006; Schilling et al. 2008b; Schilling et al. 2008a). Es ergibt sich die Annahme, dass die Inhibition der QC, als therapeutischer Ansatz der Alzheimer-Erkrankung, die Bildung von pE-A β hemmen und somit den Nidus der Amyloidose reduzieren könnte (Schilling et al. 2008a).

In den oben beschriebenen Studien an Gehirnen von Mäusen und Menschen zeigte sich eine strikt neuronale QC-Expression. In Astrozyten und Mikroglia erfolgte kein QC-Nachweis unter physiologischen Bedingungen. Es stellt sich jedoch die Frage, ob eine Expression von QC in aktivierten Gliazellen unter pathologischen Bedingungen auftritt und so gegebenenfalls zur pE-A β -Pathologie beiträgt (Hartlage-Rübsamen et al. 2009; Morawski et al. 2010).

1.3 Aktivierung von Gliazellen unter pathologischen Bedingungen

1.3.1 Aktivierung von Mikroglia

Mikroglia unter physiologischen Bedingungen

Mikroglia wurden erstmals 1932 von del Rio-Hortega beschrieben (del Rio Hortega 1932). Sie sind die immunkompetenten Zellen des ZNS und können im Falle eines schädigenden Ereignisses als Phagozyten wirken (Kim & Vellis 2005). Weiterhin spielen Mikroglia durch den Abbau von Zelltrümmern eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems (Nakajima & Kohsaka 1993). Man kann morphologisch verschiedene Formen der Mikroglia unterscheiden, von einer stark ramifizierten ruhenden Form, über aktivierte Mikrogliazellen, bis zur amöboiden phagozytierenden Form (Kreutzberg 1996).

Im Ruhezustand überwachen Mikroglia ihre unmittelbare Umgebung auf potentiell pathologische Einflüsse (Danton & Dietrich 2003). Wenn eine toxische Substanz oder Zeichen einer Zellschädigung von einer Mikrogliazelle registriert werden, wird die Aktivierungsreaktion der Zelle ausgelöst (Kreutzberg 1996). Daraufhin mobilisiert sie das Immunsystem und initiiert die Gewebereparatur (van Rossum & Hanisch 2004).

Aktivierungsreaktion von Mikroglia nach Gewebeschädigung

Die akute Immunreaktion des ZNS ist in der Lage das Hirnparenchym durch kurzfristige Inflammation nach Schädigung z.B. durch Trauma oder Ischämie zu schützen (Streit 2002). Es wird jedoch vermutet, dass eine andauernde Immunreaktion, wie die Neuroinflammation bei neurodegenerativen Erkrankungen durch Akkumulation von neurotoxischen, pro-inflammatorischen Zytokinen zum Neuronenuntergang führen kann (Skaper 2007; Block, Zecca & Hong 2007).

Tritt ein schädigender Prozess des Hirnparenchyms ein, nehmen Mikroglia die Veränderung über eine Vielzahl von Rezeptoren wie z.B. Komplement-, Zytokin-, Chemokin-, oder Scavenger- Rezeptoren wahr (Streit 2002). Als Aktivierungssignal wirken Adenosintriphosphat (ATP) aus geschädigten Neuronen (van Rossum & Hanisch 2004), sowie Interleukine, die von aktivierten Astrozyten (z.B. Interleukin (IL)-3) oder anderen bereits aktiven Mikroglia-Zellen (z.B. IL-1 und IL-6) ausgeschüttet werden (Kreutzberg 1996; Bazan 2012).

In Folge der Mikroglia-Aktivierung kommt es zu einer Proliferation und schnellen Migration von Mikrogliazellen zum Ort des pathologischen Geschehens (Danton & Dietrich 2003). Anschließend erfolgt eine Verdickung von Zellausläufern und Zellkörpern von ihrer ramifizierten Form hin zu einer Morphologie mit stark verdickten Zellausläufern, die Expression von Rezeptoren und Enzymen ändert sich und immunologische Moleküle wie z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor- α (TNF α), Chemokine, Leukotriene und Prostaglandine werden sezerniert (Kim & Vellis 2005; Verkhratsky & Butt 2013). Falls es zum Zelltod von Neuronen kommt, wandeln sich die aktivierten Zellen weiter zu ihrer phagozytierenden Form (Kreutzberg 1996). Die Aktivierungsreaktion erfolgt unmittelbar. Bereits wenige Minuten nach einem Signal kommt es zu morphologischen Veränderungen der Mikroglia und die vollständige Aktivierung nimmt nur wenige Stunden in Anspruch (Verkhratsky & Butt 2013).

Aktivierung von Mikroglia durch Ischämie

Im Falle eines ischämischen Infarktes, im Tiermodell z.B. durch transiente Okklusion der Arteria cerebri media (middle cerebral artery occlusion: MCAO), sterben die Mikroglia, die sich im Infarktkern befinden, zusammen mit Neuronen und anderen Gliazellen ab (Zhang, Chopp & Powers 1997; Danton & Dietrich 2003). Bereits 2-4 Stunden nach Reperfusion können jedoch wieder aktivierte Mikroglia in diesem Gebiet nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich aus der Penumbra eingewandert sind (Danton & Dietrich 2003).

Ruhende Mikroglia werden durch Zellrümpfer geschädigter Neurone aktiviert, wandeln sich zu ihrer amöboiden, phagozytierenden Form (Kreutzberg 1996) und tragen zur Beseitigung des nekrotischen Gewebes bei (Danton & Dietrich 2003).

Aktivierung von Mikrogliazellen in der Entstehung der Alzheimer-Demenz

Die Rolle der Mikrogliazellen in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen ist noch umstritten.

So wird einerseits angenommen, dass neurodegenerative Erkrankungen und v.a. der hier betrachtete Morbus Alzheimer in enger Verbindung mit einer chronischen Inflammation des zentralen Nervensystems stehen, bei der eine Überproduktion bzw. prolongierte Expression pro-inflammatorischer Faktoren wie IL-1 oder TNF α eine wichtige Rolle spielen (Kim & Vellis 2005; Block, Zecca & Hong 2007). Neben dem charakteristischen Neuronenverlust wird beschrieben, dass die Pathologie des Morbus Alzheimer durch eine starke reaktive Astroglieose und Mikrogliaaktivierung gekennzeichnet ist (Heneka, Rodríguez & Verkhratsky 2010) und Alzheimer-Plaques u.a. aus A β , degenerierten Neuriten, Astrozytenfortsätzen und aktivierten Mikrogliazellen bestehen, welche die wichtigste immunologische Komponente der Plaques darstellen (Itagaki et al. 1989; Nagele et al. 2004). Diese Hypothese verfolgt die Annahme, dass A β pro-inflammatorisch wirkt und Mikroglia aktiviert, welche sich in A β -Plaques sammeln und neurotoxische Faktoren wie reaktive Sauerstoffspezies, NO, TNF- α , und IL-1 freisetzen (Rogers et al. 2002; Lue et al. 2010). IL-1 wirkt unter anderem als Trigger für die Proliferation von Astrozyten, TNF α und NO sind Faktoren, die wahrscheinlich zum Neuronenuntergang bei neurodegenerativen Erkrankungen beitragen (Bazan 2012). Die Mikrogliaaktivierung wird als früher Pathomechanismus, der Neuropil-Zerstörung und Entwicklung von klinischen Symptomen lange vorausgeht, angenommen (Cagnin et al. 2006; Block, Zecca & Hong 2007). Zellen, die durch die freigesetzten neurotoxischen Substanzen geschädigt werden, wirken demnach wiederum als Stimulator für andere Mikrogliazellen, so dass es zu einem Kreislauf aus Mikrogliaaktivierung und Neuronenuntergang kommen kann (Block, Zecca & Hong 2007).

Eine andere Theorie, die „Hypothese der mikroglialen Fehlfunktion“, besagt, dass die Alterung und der Verlust neuroprotektiver Funktionen von Mikrogliazellen und nicht die Aktivierung der Mikroglia, der Tau-Pathologie und Neurodegeneration voraus geht (Streit 2004; Streit et al. 2009). So erklären sich die Autoren eine unzureichende A β -Phagozytose und Neuroprotektion durch eine Degeneration und Fehlfunktion der Mikroglia (Streit 2004). Dieser Ansatz bezieht auch das Alter der Betroffenen als Risikofaktor für die AD ein, da ein altersabhängiges Nachlassen der Mikrogliafunktion durch Faktoren wie genetische und epigenetische Einflüsse oder oxidativen Stress

beschrieben wurden (Lopes, Sparks & Streit 2008; Streit et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Tau-Ablagerungen und Amyloid-Plaques bei Alzheimer Patienten nicht von aktivierten Mikrogliazellen sondern fragmentierten, degenerierten Mikroglia umgeben waren (Streit 2004; Streit et al. 2009), was gegen die oben beschriebene Theorie der Neuroinflammation spricht. Eine Aktivierung von Mikroglia durch Amyloid und eine damit verbundene Beschleunigung des Verfalls der Mikrogliazellen, und somit eine Verbindung der beiden Theorien, hält der Autor jedoch für möglich (Streit 2004).

1.3.2 Aktivierung von Astrozyten

Astrozyten unter physiologischen Bedingungen

Astrozyten machen den größten Anteil der Gliazellen des zentralen Nervensystems aus. Ihr Verhältnis zu Neuronen beläuft sich auf 1:3 bei Nagetieren und 1:0,7 bei Menschen (Nedergaard, Ransom & Goldman 2003). Sie übernehmen im gesunden Gewebe viele Aufgaben und spielen eine bedeutende Rolle bei pathologischen Prozessen des Hirnparenchyms, wie 2010 umfassend von Sofroniew et al. dargestellt wurde (Sofroniew & Vinters 2010). Die Astrozyten stehen über ihre Endfüße in engem Kontakt zu den Blutgefäßen des ZNS und sind an der Regulation des cerebralen Blutflusses beteiligt (Iadecola & Nedergaard 2007; Gordon, Mulligan & MacVicar 2007). Untereinander sind sie durch Gap Junctions verbunden und bilden ein dichtes Netzwerk, wobei jeder Astrozyt seine eigene, nur zu etwa 5% mit anderen Astrozyten überlappende, Domäne ausfüllt (Nedergaard, Ransom & Goldman 2003). Die einzelnen Astrozyten stehen über ihre Endfüße in Kontakt mit jeweils 20.000 -120.000 Synapsen (bei Menschen sogar bis zu 2 Millionen Synapsen), regeln die Homöostase des Extrazellulärraums, sind an der synaptischen Informationsübertragung beteiligt und nehmen Einfluss auf die synaptische Plastizität, so dass man von „tripartiten Synapsen“ spricht, einem engen Kommunikationsnetzwerk zwischen Astrozyten und den prä- und postsynaptischen Endigungen von Neuronen (Perea, Navarrete & Araque 2009; Takano et al. 2009).

Reaktive Astrogliose

Im Falle einer eingetretenen Schädigung des Hirnparenchyms z.B. durch Ischämie, Tumore, Trauma oder neurodegenerative Erkrankungen kommt es zu einer Aktivierungsreaktion von Astrozyten (Pekny & Nilsson 2005). Dabei handelt es sich nicht um eine „Alles-oder-Nichts-Reaktion“, sondern um spezifisch auf die Art und das Ausmaß der Gewebeverletzung angepasste Prozesse (Sofroniew & Vinters 2010). Die Aktivierung von Astrozyten z.B. nach Ischämie erfolgt im Gegensatz zur Mikrogliaaktivierung zeitverzögert etwa ab dem 3. Tag und verläuft progredient über mehreren Wochen (Palacios et al. 1995; Nihashi et al. 2001).

Bei leichteren Gewebeschädigungen kommt es zunächst zu einer Hochregulation der GFAP-, Vimentin- und Nestin-Expression, sowie einer Hypertrophie der Zellfortsätze (Eddleston & Mucke 1993; Li et al. 2008). Schwerere Parenchymverletzungen können die Proliferation von Astrozyten und den dauerhaften Umbau des Gewebes auslösen, was zur Ausbildung einer „Glianarbe“ führt (Silver & Miller 2004). Sie bilden eine dichte Barriere, um das z.B. inflammatorische oder nekrotische Gewebe vom gesunden Hirnparenchym abzugrenzen und verhindern die Migration von Entzündungszellen von geschädigtem in gesundes Gewebe (Bush et al. 1999; Silver & Miller 2004). Bei dieser Narbenbildung interagieren Astrozyten mit anderen Zellen wie Mikroglia, Oligodendrozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, sowie extrazellulärer Matrix (Hatten et al. 1991). Sie beeinflussen ablaufende Immunprozesse z.B. durch Antigenpräsentation nach Induktion von MHC-I und MHC-II Molekülen auf ihrer Zelloberfläche und durch die Synthese von Komplementfaktoren und Zytokinen wie IL-6, Interferon- β oder TNF (Farina, Aloisi & Meinl 2007; Eddleston & Mucke 1993). Weiterhin können sie sowohl pro- als auch antiinflammatorische Einflüsse auf Mikrogliazellen ausüben (Min et al. 2006; Farina, Aloisi & Meinl 2007).

Man kann nach einem ZNS-Trauma zwei Stadien der Effekte durch eine Astrozytenaktivierung unterscheiden: zunächst die Unterstützung der Neurone im Akutstadium, der jedoch später eine hemmende Wirkung auf die Regeneration des Gewebes folgt (Pekny & Nilsson 2005), welcher eine potentielle Beteiligung an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zugeschrieben wird (Nagele et al. 2004).

Astrozytenaktivierung durch Ischämie

Im Falle eines ischämischen Infarkts im Hirnparenchym laufen viele zelluläre und subzelluläre Mechanismen ab. Der Infarktkern (Blutflussrate < 1 ml/g/min) zeigt eine Pan-Nekrose mit Zelltod von Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen durch Glutamat-Exzitotoxizität (ausgelöst durch Verlust der Ionenhomöostase unter anoxischen Bedingungen) und Azidose. In der Penumbra (Blutflussrate zwischen 2 und 4ml/g/min) lokalisierte Zellen weisen hingegen lediglich eine eingeschränkte Funktion und einen reduzierten Metabolismus auf (Verkhratsky & Butt 2013). Ein vorübergehender Verschluss einer Arterie ist assoziiert mit selektivem Verlust von Neuronen bei erhaltener Astrozytenfunktion (Takano et al. 2009).

Astrozyten, welche eine geringere Vulnerabilität als Neuronen bei Ischämie zeigen, erbringen durch Aufnahme von Glutamat und Kaliumionen, Verringerung des oxidativen Stresses der Neurone durch Hochregulation der astrozytären Gluthation-Produktion und Aufrechterhaltung der Energieversorgung von Neuronen unter hypoxischen Bedingungen die wichtigsten protektiven Funktionen nach Ischämie (Eddleston & Mucke 1993; Chen et al. 2001; Leis, Bekar & Walz 2005; Rossi, Brady & Mohr 2007; Li et al. 2008). Weiterhin sind sie durch Bildung einer Glianarbe, ca. 7-10 Tage nach dem ischämischen Ereignis, an der Begrenzung des Infarktkerns und an der Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke in der Penumbra beteiligt (Li et al. 2008; Sofroniew & Vinters 2010).

Aktivierung von Astrozyten in der Entstehung der Alzheimer-Demenz

Aktivierte Astrozyten stehen in enger Beziehung zu den β -Amyloid-Plaques, die typisch für die Alzheimer-Pathologie sind, sowie zu diffusen Amyloid-Ablagerungen und bilden dichte Begrenzungen um diese (Itagaki et al. 1989; Sofroniew 2009). Bereits Alois Alzheimer beschrieb 1910 aktivierte Astrozyten und Mikroglia, welche die Amyloid-Plaques umgeben (Alzheimer 1910). Es werden verschiedene Ansätze zur Klärung der Frage, ob diese Gliaktivierung eine Folge oder Ursache der Amyloid-Ablagerung darstellt, in der Fachliteratur diskutiert. Ziel der Versuchsreihen dieser Arbeit ist es, eine mögliche weitere Komponente der gliären Pathologie in der Alzheimer-Entstehung, eine gliäre Expression der QC, zu untersuchen.

A β wirkt in vitro als Aktivierungsfaktor für Astrozyten und kann in diesen Effekte, die mit einer neuronalen Schädigung assoziiert sind, wie z.B. Kalzium-Oszillationen,

mitochondriale Depolarisation und oxidativen Stress auslösen (Heneka, Rodríguez & Verkhratsky 2010; Nagele et al. 2004). Nach Aktivierung durch A β setzen Astrozyten ebenso wie Mikroglia eine Reihe proinflammatorischer Moleküle frei und schaffen so eine chronisch entzündliche Umgebung im Bereich von A β -Plaques (Parpura et al. 2012).

Weiterhin weisen Astrozyten in Plaque-Nähe oft hohe intrazelluläre Konzentrationen von A β ₁₋₄₂ auf, so dass Nagele et al. 2004 die Theorie aufstellten, dass die A β -Proteine von Astrozyten aus degenerierten Neuronen aufgenommen werden, da unter physiologischen Bedingungen APP nur in sehr geringer Menge von Astrozyten synthetisiert wird (Nagele et al. 2004). Jedoch wurde in verschiedenen Schädigungsmodellen gezeigt, dass die APP-Expression in aktivierten Astrozyten z.B. nach Ischämie ansteigt (Nihashi et al. 2001; Banati et al. 1995; Hall et al. 1995), sodass auch eine astrozytäre A β -Bildung möglich ist.

Weiterhin konnte bei Ratten nach Induktion einer chronischen Gliaaktivierung z.B. durch Ischämie nach permanentem Verschluss der Arteria cerebri media oder nach Zerstörung hippokampaler cholinergischer Neurone durch Injektion von 192-IgG-Saporin (SAP), die Expression von BACE-1 (β -Sekretase) in aktivierten Astrozyten nachgewiesen werden (Hartlage-Rübsamen et al. 2003). Es gelang ebenfalls BACE-1 in Astrozyten in unmittelbarer Umgebung zu A β -Plaques im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten nachzuweisen. Diese Induktion der BACE-1-Expression in reaktiven Astrozyten gibt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer chronischen Astrozytenaktivierung und der Entstehung von A β -Plaques in der Alzheimer-Pathologie (Hartlage-Rübsamen et al. 2003).

1.4 QC-Expression in Gliazellen – eine mögliche Brücke zwischen Inflammation und Neurodegeneration?

Die QC spielt eine entscheidende Rolle in der Alzheimer-Pathologie, da sie die Zyklisierung von N-terminalem Glutamat an $A\beta_{3-40/42}$ zu $A\beta_{pE3-40/42}$ katalysiert, welches wahrscheinlich den Aggregationskern für $A\beta$ -Ablagerungen bildet. Bisher wurde nur eine strikt neuronale Expression der QC in unbeeinflusstem Hirngewebe von Mäusen und Ratten nachgewiesen. Da aber aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten einen konstanten Faktor in der Alzheimer-Pathologie darstellen, ist eine Expression von QC in Gliazellen mit daraus folgender gliärer Bildung von pE- $A\beta$ und somit eine Verbindung zwischen chronischer Inflammation und einem Beitrag zur Neurodegeneration denkbar.

Wie bereits in den letzten Kapiteln beschrieben, konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass nach einem schädigenden Ereignis wie z.B. einer ischämischen Periode die Expression von APP in Astrozyten hochreguliert wird. Weiterhin wurde das Enzym BACE-1 in aktivierten Astrozyten nach Ischämie und nach cholinergem Immunoläsion nachgewiesen und in Plaque-assoziierten aktivierten Astrozyten zeigten sich hohe Konzentrationen von $A\beta_{1-42}$, welches wahrscheinlich in den Astrozyten gebildet wird. Der Nachweis von QC in Astrozyten wäre somit der nächste Schritt zur Untersuchung, inwiefern Astrozyten an der Entstehung toxischer $A\beta_{pE3-40/42}$ -Peptide beteiligt sind und so zur $A\beta$ -Pathologie beitragen.

Ein weiterer Faktor, der zur Fragestellung dieser Arbeit beigetragen hat, ist die Tatsache, dass sich die Wahrscheinlichkeit an einer Demenz zu erkranken nach Schlaganfall verdoppelt und dass der Morbus Alzheimer etwa 30% dieser Demenz-Fälle nach Schlaganfall ausmacht (Henon et al. 2001; Savva & Stephan 2010). Da die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten durch schädigende Ereignisse wie einen ischämischen Infarkt eingeleitet wird, ist ein Zusammenhang zwischen Ischämie und Alzheimer-Demenz über eine Hochregulation von APP und BACE-1 sowie eine mögliche Expression von QC mit Bildung von pE- $A\beta$ in aktivierten Astrozyten denkbar. Ein ähnliches Szenario ist bei cholinergem Zellverlust im basalen Vorderhirn und daraus folgender Gliaaktivierung, wie er bei der AD auftritt, möglich.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von QC in aktivierten Astrozyten und Mikroglia zu untersuchen und so einen Beitrag zur Klärung der Zusammenhänge zwischen der Aktivierung von Gliazellen in der Plaque-Umgebung und der A β -Pathologie zu leisten.

Zur Induktion der Gliaaktivierung sollten zwei tierexperimentelle Schädigungsmodelle genutzt werden, die einen Bezug zur AD haben. Zum einen wurden Ratten einer Mikroinjektion von 192-IgG-Saporin unterzogen, einem Neurotoxin, welches spezifisch cholinerge Neurone des basalen Vorderhirns schädigt. Zum anderen wurde bei Mäusen eine fokale Ischämie durch transiente Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) induziert.

Durch einen immunhistochemischen Nachweis sollte die Abnahme der cholinergen Neurone im basalen Vorderhirn durch die Wirkung des Immunotoxins 192-IgG-Saporin und durch Darstellung der Aktivierung des Hitzeschock-Protein 27 (HSP 27) das Ausmaß des Ischämiegebiets im Mäusegehirn gezeigt werden. Anschließend sollte die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia im Schädigungsgebiet und in sekundär betroffenen Projektionsgebieten dargestellt werden. Schließlich sollte durch immunhistochemische Doppelmarkierungen von QC- und Gliamarkern die Expression von QC in Astrozyten bzw. Mikroglia untersucht werden, um eine Verbindung zwischen einer schädigungsgetriggerten Gliaaktivierung und der A β -Pathologie herzustellen.

3 Material und Methoden

3.1 Schädigungsmodell mit Verlust cholinergener Neurone des basalen Vorderhirns

3.1.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung einer möglichen Expression von QC in aktivierten Gliazellen wurden cholinerge Projektionsneurone des basalen Vorderhirns von Ratten selektiv ausgeschaltet. Für diese Versuchsreihe wurden weibliche Wistar Ratten (250-300g) im Alter von zwei bis drei Monaten einer stereotaktischen Operation unterzogen (n=9). Als Kontrollen mit Intervention wurden Wistar Ratten Maus-IgG-SAP (n=2) und NaCl 0,9% (n=1) in den Seitenventrikel injiziert. Als Kontrolle ohne Intervention wurde eine drei Monate alte Ratte gewählt, die gleich aufwuchs und deren Hirngewebe jeweils den gleichen Vorbehandlungen und Färbemethoden unterzogen wurde. Es wurden junge Ratten ausgewählt, um eine physiologisch auftretende Degeneration zu vermeiden und eine möglichst gute Erholung nach dem Eingriff zu erzielen. Das Klima im Tierlabor wurde kontrolliert und alle Ratten hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden. Alle Experimente wurden von der Landesdirektion Leipzig genehmigt (TVV 19/09).

3.1.2 Stereotaktische Mikroinjektion von 192-IgG-SAP

Die Ratten wurden mit 400 µl Ketamin-Ratiopharm® (50 mg/ml) und 80 µl Rompun® (Xylazin 5 mg/ml) anästhesiert, indem die Pharmaka nacheinander intramuskulär injiziert wurden. Nach Prüfung der tiefen Anästhesie, wurde die Kalotte der Tiere nach Einschnitt der Schädelhaut im stereotaktischen Apparat (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA) fixiert. Dabei lagen der Bregma- und der Lambda-Punkt auf der gleichen Höhe. Die Injektionsnadel wurde in der gewünschten Position nach Koordinaten des Ratten-Gehirnatlas nach Paxinos (Paxinos & Watson 1986) justiert und mit einem Zahnarztbohrer (TZ401, MLW, Treffurt, Deutschland) ein Loch von ungefähr 1,5 mm Durchmesser in den Schädel gebohrt. Anschließend wurde die Injektionsnadel auf eine Tiefe von 4 mm unter die Hirnoberfläche abgesenkt und die Mikroinjektion von 10 µl 192-IgG-SAP (n=7, 4-mal rechter Ventrikel, 3-mal linker Ventrikel) bzw. 10 µl Maus-IgG-SAP (n=2 Kontrollen) über einen Zeitraum von ca. 30 min mit einer Mikroliterspritze (Bonaduz, Graubünden, Schweiz) in den

Seitenventrikel durchgeführt. Die ausgewählten Koordinaten waren AP 0,4 mm; lateral +/- 1,4 mm; DV 4,0 mm nach Paxinos (Paxinos & Watson 1986). Aufgrund der durchgeführten Anästhesie blieben die Augen der Ratten offen, daher wurden befeuchtende Augentropfen verabreicht, um eine Verletzung der Augen zu verhindern.

Nach der Operation wurden die Ratten aus dem stereotaktischen Apparat genommen. Die Wunde wurde mit 2% H₂O₂ desinfiziert und mit Histoacryl[®] verschlossen. Um eine optimale Erholung von der Operation zu gewährleisten wurde eine lokale Antibiose (Framycetinsulfat, Leukase N Puder[®]) und ein lokales Anästhetikum (Lidocain) appliziert. Weiterhin wurde das Trinkwasser mit 60 µl Novalgin[®] (Metamizol 500 mg/ml) versetzt, um eine postoperative Schmerzlinderung zu erzielen. Während der Überlebensperiode (8-10 Tage) wurden die Ratten täglich bezüglich Ess- und Trinkverhalten, Ausscheidung und Verhalten überwacht.

3.1.3 Das Immunotoxin: 192-IgG-SAP

192-IgG-SAP (Advanced Targeting Systems) ist ein Konjugat aus einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen den Neurotrophin-Rezeptor p75NTR, welcher von cholinergen Zellen des basalen Vorderhirns exprimiert wird, und dem Ribosomen-inaktivierenden Protein Saporin. Durch intraventrikuläre Injektion des Immunotoxins werden spezifisch ChAT-positive Zellen des basalen Vorderhirns inklusive medialem Septum, horizontalem und vertikalem Diagonalband von Broca und Nucleus basalis magnocellularis um bis zu 95% reduziert (Rossner et al. 1995). Die Immunoläsion resultiert in einer starken Mikroglia- und Astrozytenaktivierung in den cholinergen Gebieten des basalen Vorderhirns und einer moderaten Aktivierung von Mikrogliazellen im Projektionsgebiet Hippocampus (Rossner et al. 1995; Lemke et al. 1998).

3.1.4 Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie

Nach 8-10 Tagen Überlebenszeit wurden die Ratten mit CO₂ euthanasiert und zunächst mit 100 ml einer Lösung aus 0,9% Natrium-Chlorid und 0,1% Heparin und anschließend mit 400 ml einer Fixierungslösung aus 4% Formaldehyd und 0,1% Glutaraldehyd in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, 0,1M, pH 7,4) transkardial perfundiert. Nach der Perfusion wurden die Ratten dekapitiert und die Gehirne entnommen. Das Gewebe wurde mit der gleichen Lösung über Nacht bei 4°C nachfixiert. Anschließend wurde eine Kryoprotektion für minimal 2 Tage in einer Lösung aus 30% Saccarose in 0,1M PBS durchgeführt und das Gewebe bis zur Anfertigung der Schnitte in dieser Lösung bei 4°C gelagert.

Am Schlittenmikrotom (Leica, LS 2000, Wetzlar, Deutschland) wurden im gefrorenen Zustand 30 µm dicke koronare Schnitte hergestellt und in einer PBS-Lösung mit 0,025% Natriumazid (NaN₃, PH 7,4) als Konservierungsstoff bis zur Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen gelagert. Die Auswahl der Schnittebenen für die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte anhand des Atlas nach Paxinos (Paxinos & Watson 1986)

Die Operation, die stereotaktische Mikroinjektion, Tötung und Perfusion der Tiere wurden von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe im Paul-Flechsig-Institut vorgenommen.

3.2 Schädigungsmodell der fokalen Ischämie durch transiente Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO)

3.2.1 Versuchstiere

Für das zweite Schädigungsmodell mit Induktion eines fokalen Schlaganfalls durch transiente MCAO wurden 9 Monate alte Mäuse (n=6) ausgewählt. Als Kontrolle für die physiologische HSP 27 und QC-Expression wurde eine nicht-operierte Wildtyp-Maus untersucht. Die Tiere wurden mit freiem Zugang zu Wasser und Futter mit Tag/Nacht-Zyklen von jeweils 12 Stunden bei einer Raumtemperatur von 22°C gehalten (Sieber et al. 2010).

3.2.2 Induktion fokaler Ischämie durch 30 min MCAO

Die Mäuse wurden zur Induktion einer fokalen Ischämie einer 30-minütigen Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) unterzogen (Sieber et al. 2010). Unter tiefer Anästhesie mit 2,5% Isofluran in einem 3:1 Gemisch von N₂O:O₂ wurden die Arteria carotis communis, die Arteria carotis externa und die Arteria carotis interna (ACI) sorgfältig von umgebenen Nerven und Faszien abpräpariert. Über eine Inzision der Arteria carotis communis rechts wurde ein 7-0-Monofilament (70SPRe, Docol Corporation, USA) mit einem Überzug aus Silikongummi an der Spitze (0.2 +/- 0,01 mm Durchmesser) in die Arteria carotis interna bis zum Circulus arteriosus Willisi eingeführt. In dieser Position wurde die Arteria cerebri media (ACM) durch den Faden verschlossen. Während der 30-minütigen Okklusion wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere durch ein Wärmekissen in einem physiologischen Bereich gehalten. Nach 30 Minuten erfolgte die Entfernung des Fadens, um den cerebralen Blutfluss wiederherzustellen.

3.2.3 Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie

Zwei bzw. sieben Tage nach der Operation wurden die Mäuse für 2 Minuten mit PBS und anschließend für 8 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) mit einer Flussrate von 3 ml/min perfundiert. Es fand eine Nachfixierung mit 4% Formaldehydlösung für 5 Stunden statt, bevor eine Kryoprotektion zunächst mit 10% Saccharose, dann mit 30% Saccharose durchgeführt wurde. Die Gehirne wurden bei -25° mit Methylbutan gefroren und anschließend bei -80° bis zur immunhistochemischen Untersuchung gelagert. Am Schlittenmikrotom (Leica, LS 2000, Wetzlar, Deutschland) erfolgte die Herstellung 30 µm dicker Schnitte, welche in 0,1 M PB-Puffer mit 0,025% NaN₃ (pH 7,4) bei 4°C gelagert wurden. Die Auswahl der Schnittebenen erfolgte anhand des Atlas nach Franklin und Paxinos (Franklin & Paxinos 1997).

Die Aufzucht der Mäuse, Operation, MCAO, Tötung der Tiere, Perfusion und Kryoprotektion wurde von der Arbeitsgruppe Frahm der neurologischen Abteilung der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

3.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Alle immunhistochemischen Markierungen wurden an frei schwimmenden Schnitten durchgeführt. Für Details zu Antikörpern und Konzentration siehe Tabelle 1.

Zunächst wurde das Gewebe in PB-Puffer geschwenkt, um das Natriumazid der Konservierungslösung auszuwaschen. Zur Demaskierung von Antigenen wurde das Gewebe der Ratten-Versuchsreihe (bis auf die ChAT-Immunhistochemie), nicht jedoch die Mäuse-Schnitte, zunächst in 0,1 M Citrat für 1 Minute auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine Vorbehandlung aller Schnitte mit 1% H₂O₂ in 60% Methanol für 30 Minuten, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren und das Gewebe auf die Antikörperaufnahme vorzubereiten, ruhten die Präparate für 30 Minuten in 5% Eselnormals Serum (ENS) bzw. Ziegennormalserum (GNS) und 0,3% Triton-X100 in 0,1 M Tris-gepuffertem Kochsalz (TBS). Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Ab1301 für QC, Anti-GFAP für Astrozyten, Anti-Iba-1 bzw. Anti-CD11b für Mikroglia bei Mäusen und Anti-HSP 27) bzw. dem Lektin bio-GSA für Mikroglia bei Ratten erfolgte in 5% GNS bzw. ENS, 0,1% Triton-X in 0,1 M TBS für 1-3 Nächte schwenkend bei 4°C in einer feuchten Kammer.

3.3.1 Visualisierung mit DAB

Nach Inkubation des Primärantikörpers und einem Waschschrift erfolgte die Zugabe des biotinylierten Sekundärantikörpers in 2% Rinderserum-Albumin (BSA) in 0,1 M TBS für 60 Minuten. Die einzige Ausnahme bildete die Mikroglia-Histochemie bei Ratten, da das verwendete GSA bereits biotinyliert war. Schließlich wurde das Gewebe nach der ABC-Methode für 60 Minuten mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HRP) in 2% BSA, 0,1 M TBS inkubiert.

Die Bindung der Peroxidase wurde durch 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) visualisiert. Um Astrozyten, Mikroglia, QC und HSP 27 darzustellen, wurde das Gewebe mit 4 mg DAB und 2,5 µl H₂O₂ auf 5 ml Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,6) für 1-2,5 Minuten inkubiert. Durch die enzymatische Reaktion ergab sich eine braune Markierung.

Die Darstellung der ChAT-positiven Neurone erfolgte durch Inkubation mit 40 mg Nickel, 4 mg DAB und 5 µl H₂O₂ in 10 ml DAB-Puffer für 2 Minuten, woraus eine schwarze Markierung cholinergischer Neurone resultierte.

3.3.2 Doppelmarkierung mittels Immunfluoreszenz

Um eine Expression von QC in Astrozyten bzw. Mikrogliazellen oder eine Ko-Expression von QC und HSP 27 zu untersuchen, wurden Doppelmarkierungen mit Immunfluoreszenz-Farbstoffen durchgeführt. Für weitere Hinweise zu den Antikörpern und zu deren Verdünnungen siehe Tabelle 1.

Nach oben beschriebener Vorbehandlung und Einwirken des Primärantikörpers gegen QC (AB1301) für zwei bis drei Tage, wurde das Gewebe mit einem biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper in 0,1 M TBS mit 2% BSA für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch ein Carbocyanin 2 (Cy2)-markiertes Streptavidin, welches anschließend 60 Minuten lang mit den Schnitten in 0,1 M TBS und 2% BSA inkubiert wurde, oder durch einen direkt Cy2-markierten Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper.

Die Markierung von Astrozyten erfolgte durch einen direkt Cy3-markierten Maus-anti-GFAP-Antikörper, welcher zusammen mit dem Streptavidin-Cy2 (zur Visualisierung von QC, bzw. HSP 27) 60 Minuten auf das Gewebe einwirkte.

Der Nachweis von Mikroglia wurde in der Rattenversuchsreihe durch das biotinylierte Lektin GSA erreicht, welches zusammen mit dem primären QC-Antikörper appliziert wurde. Die Visualisierung erfolgte durch ein Cy3-markiertes Streptavidin, welches zusammen mit dem Cy2-markierten Sekundärantikörper für den QC-Nachweis angewandt wurde.

In der Mäuseversuchsreihe wurde für die Doppelmarkierung von QC und Mikroglia ein Antikörper gegen CD11b benutzt, da sowohl die Antikörper gegen Iba-1- als auch gegen QC aus Kaninchen stammen und so nicht für Doppelmarkierungen eingesetzt werden konnten. Der CD11b-Antikörper wurde mit dem QC-Primärantikörper appliziert und durch einen Cy3-markierten Ziege-anti-Ratte Sekundärantikörper in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

Der HSP 27-Antikörper wurde zur Doppelmarkierung mit QC mit dem Ab1301-Antikörper angewandt und durch einen Cy3-markierten Ziege-anti-Ratte Sekundärantikörper markiert. Zur Doppelmarkierung mit Astrozyten, wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper Esel-anti-Ziege und schließlich ein Cy2-markiertes Streptavidin eingesetzt.

Zwischen allen Inkubationszeiten wurden die Schnitte jeweils 3-mal für 5-10 Minuten in 0,1 M TBS gewaschen. Alle Färbungen wurden durch Weglassen des Primärantikörpers auf eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers geprüft.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate wurde mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop (Zeiss, Deutschland) durchgeführt. Die mikroskopischen Bilder in 2,5-, 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung wurden mit einer AxioCam HRC aufgenommen, welche mit dem Axiovision 4.8 Bildanalyse System (Zeiss, Germany) verbunden war.

3.4.2 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Zur Aufnahme der Doppelmarkierung von QC mit Astrozyten, Mikroglia oder HSP 27, bzw. Astrozyten mit HSP 27 wurde ein Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) benutzt. Zur Anregung der Cy2-markierten QC- bzw. HSP 27-Expression wurde ein Argon-Laser mit einer Anregung bei 488 nm eingesetzt und die Cy2-Emission bei 510 nm unter Anwendung eines Niedrigfrequenzfilters (505-550 nm) aufgenommen. Für die Anregung der Cy3-markierten GFAP-, GSA-, HSP 27- und CD11b-Markierungen wurde ein Helium-Neon-Laser mit 543 nm Anregung verwendet und die Emission der Cy3-Markierungen wurden bei 570 nm unter Verwendung eines Hochfrequenzfilters (560-615 nm) registriert.

Die Bildbearbeitung der lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Photoshop 7.0 (Adobe System). Es wurden minimale Anpassungen von Lichtintensität, Farbsättigung, Schärfe und Kontrast vorgenommen.

3.4.3 Quantifizierung der cholinergen Zellen

Die Quantifizierung erfolgte durch manuelles Auszählen der markierten Zellen in der Ni-DAB-Färbung von ChAT-positiven Neuronen mithilfe des Programms Axiovision 3.1. Als Zelle wurden markierte Objekte von mindestens 10 µm Größe mit mindestens einem Zellausläufer gewertet. Die Grenzen der cholinergen Zielgebiete wurden anhand des Atlanten nach Paxinos für Ratten festgelegt (Paxinos & Watson 1986).

Tabelle 1 Übersicht der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen und verwendeten Antikörper.

Darstellung von	Primärantikörper gegen (Verdünnung, Spezies, Firma)	Sekundärantikörper (Verdünnung, Firma)	Visualisierung (Verdünnung, Firma)
Ratten-Versuchsreihe			
cholinergen Neuronen	ChAT (1:500, Ziege, Millipore)	Esel-anti-Ziege (1:200, Dianova) biotinyliert	Streptavidin-Peroxidase (1:1000, Sigma), Ni-DAB
Astrozyten	GFAP (1:500, Kaninchen, Sigma)	Ziege-anti-Kaninchen (1:200, Dianova) biotinyliert	Streptavidin-Peroxidase (1:1000), DAB
Mikroglia	GSA (1:100, Lektin, Sigma) biotinyliert		Streptavidin-Peroxidase (1:1000), DAB
QC	QC (1:500, Kaninchen, Ab1301, Probiobdrug)	Ziege-anti-Kaninchen (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Peroxidase (1:1000), DAB
Doppelmarkierung: QC und Astrozyten	QC (1:500, Ab1301) GFAP-Cy3 (1:400, Maus, Sigma)	Ziege-anti-Kaninchen (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Cy2 (1:50, Dianova)
Doppelmarkierung: QC und Mikroglia	QC (1:500, Ab1301) GSA (1:100, Lektin) biotinyliert	Ziege-anti-Kaninchen-Cy2 (1:50, Dianova)	Streptavidin-Cy3 (1:50, Dianova)
Maus-Versuchsreihe			
HSP 27	HSP 27 (1:1000, Ziege, Santa Cruz)	Esel-anti-Ziege (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Peroxidase (1:1000), DAB
Astrozyten	GFAP (1:500)	Ziege-anti-Kaninchen (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Peroxidase (1:1000), DAB
Mikroglia	Iba-1 (1:100, Kaninchen, Wako)	Ziege-anti-Kaninchen (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Peroxidase (1:1000), DAB
QC	QC (1:500, Ab1301)	Esel-anti-Kaninchen (1:200, Dianova) biotinyliert	Streptavidin-Peroxidase (1:1000), DAB
Doppelmarkierung: HSP 27 und Astrozyten	HSP 27 (1:500) GFAP-Cy3 (1:400)	Esel-anti-Ziege (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Cy2 (1:50)
Doppelmarkierung: QC und Astrozyten	QC (1:200, Ab1301) GFAP-Cy3 (1:400)	Ziege-anti-Kaninchen (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Cy2 (1:50)
Doppelmarkierung: QC und HSP 27	QC (1:200, Ab1301) HSP 27 (1:500)	Esel-anti-Kaninchen (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Cy2 (1:50), Esel-anti-Ziege-Cy3 (1:100, Dianova)
Doppelmarkierung: QC und Mikroglia	QC (1:200) (Ab1301) CD11b (1:50, Ratte, Santa Cruz)	Ziege-anti-Kaninchen (1:200) biotinyliert	Streptavidin-Cy2 (1:50) Ziege-anti-Ratte-Cy3 (1:100, Dianova)

4 Ergebnisse

4.1 Immunoläsion cholinergischer Neurone

Das Netzwerk cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns wurde als Angriffspunkt der Immunoläsion für diese Versuchsreihe ausgewählt, da es in der Alzheimer-Pathologie eine entscheidende Rolle spielt (siehe Abschnitt 1.2.1). Das basale Vorderhirn umfasst das mediale Septum, das vertikale sowie das horizontale Diagonalband, mit ihren Projektionsbahnen zum Hippocampus und limbischen Cortex, ebenso wie die cholinergen Neurone des Nucleus basalis magnocellularis (Nbm) mit Axonen zum Neocortex (Schliebs & Arendt 2011). Die Areale boten ein breites Feld zur Untersuchung der spezifischen Auswirkung einer selektiven Immunoläsion durch das Neurotoxin 192-IgG-Saporin auf die Induktion der QC-Expression in durch cholinergen Zellverlust aktivierten Gliazellen. Nachfolgend werden die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia als Reaktion auf den Untergang cholinergischer Neurone, die Expression von QC und der Nachweis dieses Enzyms in den aktivierten Gliazellen der beschriebenen Hirnregionen dargestellt. Für die bildliche Gegenüberstellung wurden jeweils die Ergebnisse des Kontrolltiers ohne stereotaktische Operation ausgewählt.

4.1.1 Neuronenverlust in cholinergen Gebieten des basalen Vorderhirns

In Abbildung 1 sind die immunhistochemischen Darstellungen des cholinergen Neuronenverlusts nach Immunoläsion mit 192-IgG-SAP (Injektion in den Seitenventrikel) im basalen Vorderhirn in der Schnittebene 0,70 mm posterior von Bregma dokumentiert. Als Kontrollen sind diesem eine Ratte, die eine Maus-IgG-SAP Injektion erhalten hat, und ein Tier, das mit 0,9%-Kochsalz (NaCl)-Lösung injiziert wurde, gegenüber gestellt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass es bei den Ratten mit Injektion von 192-IgG-SAP auf der ipsilateralen Seite der Injektion zu einer fast vollständigen Degeneration der vom ChAT-Antikörper erkannten, cholinergen Neurone im medialen Septum, im vertikalen und im horizontalen Diagonalband gekommen ist. Auf der kontralateralen Seite ist ebenfalls eine erhebliche Reduktion der Nervenzellen zu verzeichnen. Als Beispiel ist ein Ausschnitt des medialen Septums in höherer Vergrößerung (b) dargestellt.

Im Vergleich dazu ist bei den beiden Kontrolltieren kein wesentlicher Seitenunterschied zu erkennen. Man findet in den drei, auf dieser Schnittebene enthaltenen, cholinergen Gebieten eindeutig mehr angefärbte Neurone als nach Immunoläsion.

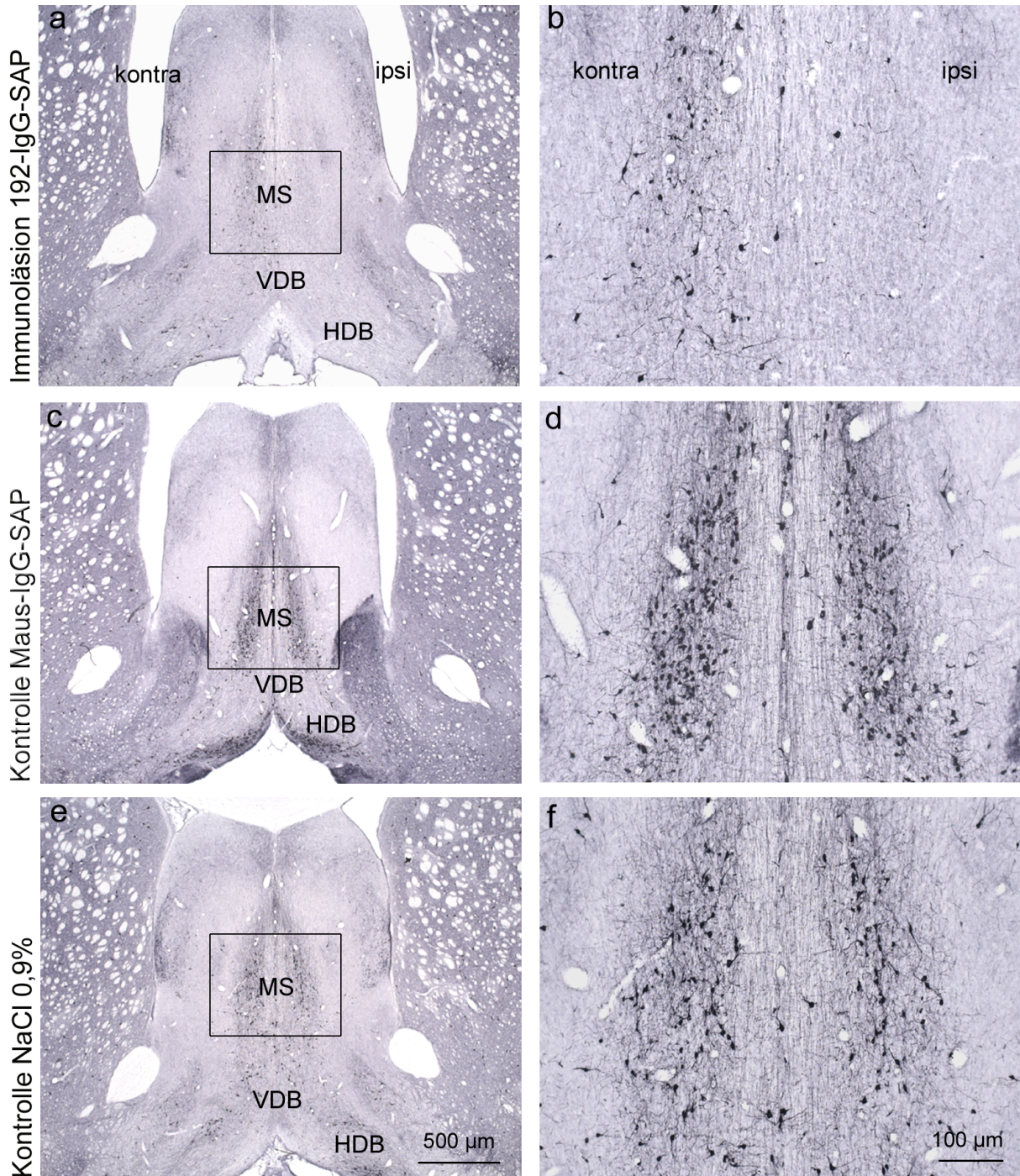


Abbildung 1: ChAT-Immunhistochemie: Verlust cholinergener Neurone im basalen Vorderhirn. a, b Immunolésionstier. Fast vollständiger Verlust der cholinergenen Neurone ipsilateral zur 192-IgG-SAP-Injektion, kontralateral ebenfalls deutliche Reduktion ChAT-positiver Nervenzellen c, d Kontrolltier mit Maus-IgG-SAP-Injektion. Physiologische Anzahl cholinergener Neurone, keine Seitendifferenz erkennbar. e, f Kontrolle mit Injektion von 0,9%-NaCl-Lösung. Physiologische Verteilung cholinergener Neurone, keine signifikante Seitendifferenz. MS mediales Septum, VDB vertikales Diagonalband, HDB horizontales Diagonalband. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

In Abbildung 2 ist die Verteilung cholinergischer Neurone getrennt für die drei untersuchten Kerngebiete mediales Septum, vertikales Diagonalband und horizontales Diagonalband als Mittelwert der Neuronenzahl für die Läsions- und die Kontrolltiere dargestellt. Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Tiere sind relativ große Standardabweichungen zu verzeichnen. Jedoch lässt sich auch bei dieser Stichprobe ein deutlicher Unterschied zwischen immunlädierten Ratten und Kontrolltieren erkennen. Vor allem im Bereich des medialen Septums erkennt man, wie auch in der immunhistochemischen Abbildung 1 gezeigt, den fast vollständigen Verlust cholinergischer Neurone ipsilateral zur Toxininjektion bei den Immunläsions-Versuchstieren, während bei den Kontrollratten ein physiologisches Vorkommen an ChAT-positiven Neuronen zu verzeichnen ist. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in geringerer Ausprägung für das vertikale und das horizontale Diagonalband. Auch für diese Kerngebiete erkennt man eine verringerte Anzahl cholinergischer Neurone bei den Immunläsions-Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren.

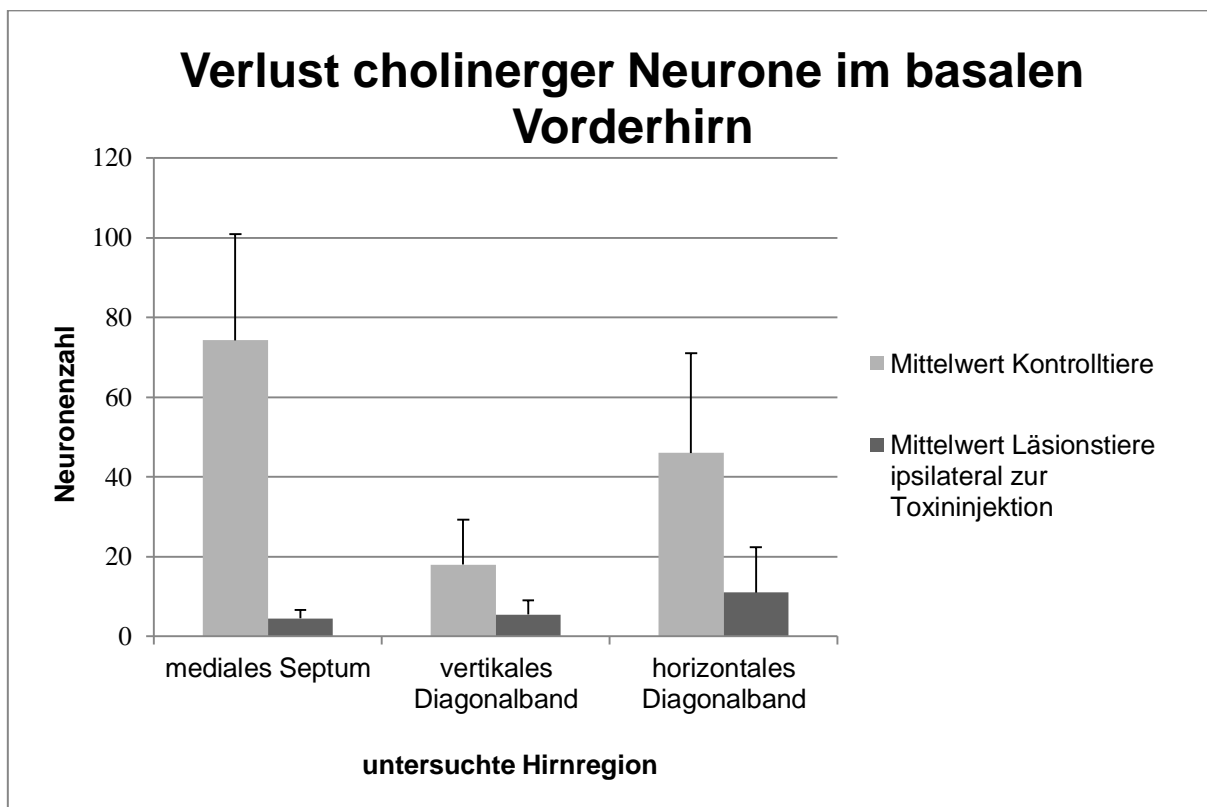


Abbildung 2: Verlust cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn. Darstellung der Neuronenzahl in den drei untersuchten Regionen des basalen Vorderhirns: mediales Septum, vertikales Diagonalband und horizontales Diagonalband. Gegenübergestellt sind die Mittelwerte der Zellzahl bei Läsionstieren ipsilateral zur Toxininjektion (dunkelgraue Balken), und die Mittelwerte der Neuronenzahl für die Kontrolltiere (hellgraue Balken). Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen zu erkennen.

4.1.2 Astrozytenaktivierung nach Immunoläsion mit 192-IgG-SAP

Astrozytenaktivierung in Läsionsgebieten des basalen Vorderhirns

Dem Wirkungsort des 192-IgG-Saporins entsprechend wurde das basale Vorderhirn mit seinen cholinergen Gebieten mediales Septum, sowie horizontales und vertikales Diagonalband und der Nbm zur Untersuchung ausgewählt, da sie von einer Neuronenschädigung durch das Immunotoxin direkt betroffen waren.

Abbildung 3 verdeutlicht in den Bildern a-c, dass in den drei cholinergen Kerngebieten dieser Schnittebene, dem medialen Septum, dem vertikalen und dem horizontalen Diagonalband, im Gegensatz zum umliegenden Gewebe eine moderate Astrozytenaktivierung v.a. ipsilateral zur Injektion erfolgt ist. Man kann daher auf eine spezifische Aktivierung nach toxischer Wirkung des 192-IgG-SAP schließen. In dem beispielhaft vergrößerten Ausschnitt aus dem medialen Septum sind die aktivierten Astrozyten ipsilateral, vereinzelt auch kontralateral, gut zu erkennen (Pfeile in Abb. 3 c).

Die hier dargestellte Kontrolle ohne Injektion (Abb. 3 d-f) wies keine Zeichen der Astrozytenaktivierung auf. Auch bei den Kontrolltieren mit Injektion von Maus-IgG-SAP zeigte sich keine spezifische Astrozytenreaktion.

In Abbildung 3 g-i ist der Nbm, ein cholinerges Gebiet des basalen Vorderhirns mit Projektion zum Neocortex, nach Immunoläsion dargestellt. Es zeigt sich im Immunotoxin-Versuchstier ebenfalls eine spezifische, lokale Astrozytenaktivierung um das Kerngebiet herum. Im Bereich des cholinergen Fasernetzes sind keine Astrozyten markiert. Wie im Abschnitt 4.1.3 verdeutlicht wird, finden sich in diesem Areal aktivierte Mikroglia. Es zeigt sich bei den Versuchstieren mit 192-IgG-SAP-Injektion keine Astrozytenaktivierung kontralateral zum Injektionsort (Seitenvergleich nicht gezeigt).

Im Bereich des Nbm der Kontroll-Ratte ohne Injektion (Abb. 3 j-l) findet sich keine Aktivierung von Astrozyten. Nur vereinzelt sind ruhende Zellen markiert, welche physiologisch vorkommen. Es ist kein Unterschied zwischen den beiden Hemisphären zu erkennen (Seitenvergleich nicht gezeigt). Die Kontrolltiere mit Injektion von Maus-IgG-SAP wiesen ebenfalls keine spezifische Astrozytenaktivierung im Bereich des cholinergen Kerngebiets auf.

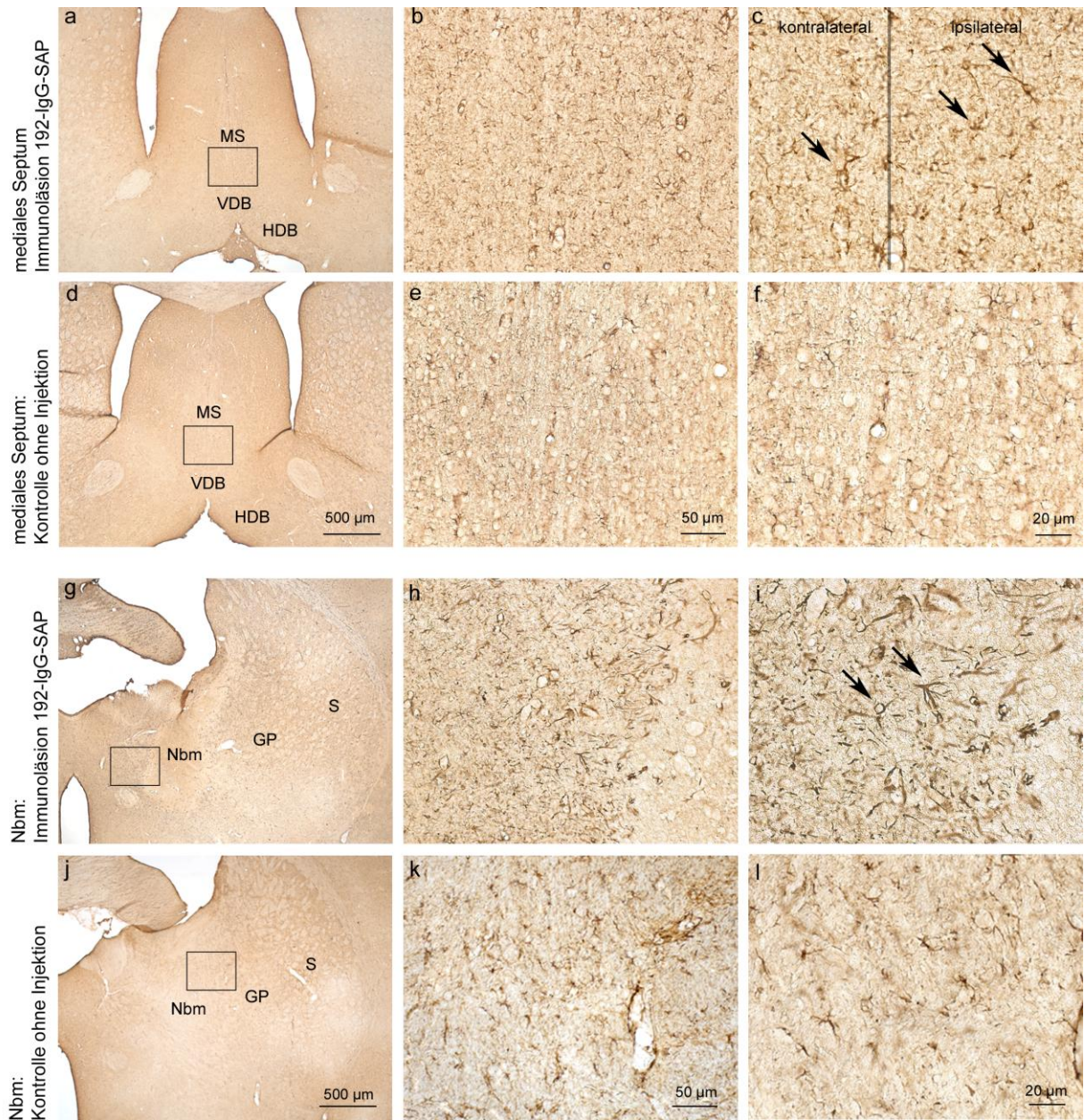


Abbildung 3: GFAP-Immunhistochemie: Astrozytenaktivierung im basalen Vorderhirn. a-c Markierung aktivierter Astrozyten nach Immunoläsion in den drei cholinergen Gebieten dieser Schnittebene ipsilateral zur Injektion. Im medialen Septum zeigt sich eine beidseitige Aktivierung, vor allem jedoch ipsilateral (c Pfeile). d-f Bei dem Kontrolltier ohne Injektion ergaben sich keine Hinweise auf eine Astrozytenaktivierung, es sind lediglich einige ruhende Astrozyten abgebildet (f). g-i Immunoläsions-Ratte. Markierung aktivierter Astrozyten durch den GFAP-Antikörper. Im Randbereich der Kernregion finden sich viele, stark aktivierte Astrozyten (i Pfeile). Der Nbm ist ausgespart (dort zeigen sich aktivierte Mikroglia (siehe Abbildung 5)). j-l Kontrolltier ohne Injektion. Keine Darstellung aktivierter Astrozyten. Lediglich einige ruhende Zellen sind durch den GFAP-Antikörper markiert (l). Der Kasten in a, d, g, j begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe. MS mediales Septum, VDB vertikales Diagonalband, HDB horizontales Diagonalband Nbm Nucleus basalis magnocellularis, GP Globus pallidus, S Striatum. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

Astrozytenaktivierung im Hippocampus

Der Hippocampus, als Projektionsgebiet der cholinergen Neurone des medialen Septums und des vertikalen Bands von Broca, ist auf Grund seiner entscheidenden Rolle in der Alzheimer-Pathologie besonders interessant für die Betrachtung dieser Versuchsreihe. Auch hier findet sich bei der Immunoläsions-Ratte, vor allem im Gyrus dentatus, eine Aktivierung von Astrozyten (Abb. 4 a-c). Die Aktivierungsreaktion ist weniger stark ausgeprägt als in den cholinergen Kerngebieten (siehe Abbildung 3), jedoch im Vergleich zu der gezeigten Kontrolle deutlich zu erkennen. Erneut zeigt sich ein Unterschied zur kontralateralen Seite, nur ipsilateral zur Schädigung hat im Hippocampus eine Aktivierung von Astrozyten stattgefunden (Seitenvergleich nicht gezeigt).

Bei der Kontrollratte ohne Injektion erkennt man die physiologisch vorkommenden, ruhenden Astrozyten des Gyrus dentatus (GD) (Abb. 4 d-f). Eine Markierung aktivierter Zellen wurde nicht nachgewiesen. Ebenso ist kein Seitenunterschied zu verzeichnen.

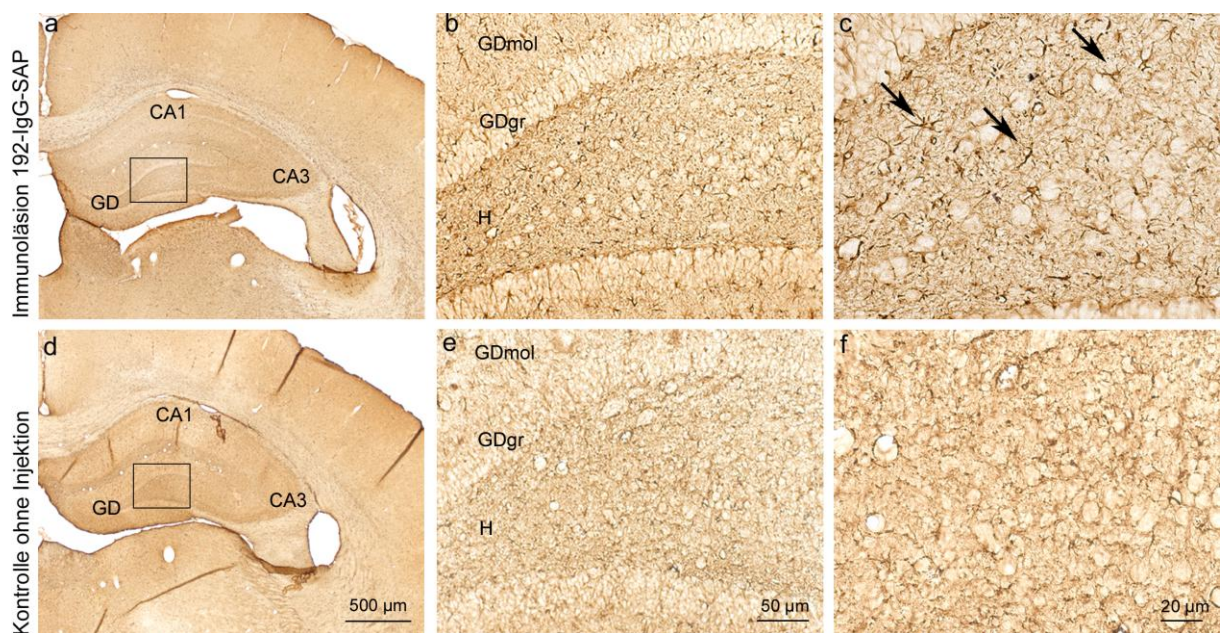


Abbildung 4: GFAP-Immunhistochemie: Astrozytenaktivierung im Hippocampus. a-c Immunoläsions-Ratte. Markierung aktivierter Astrozyten durch den GFAP-Antikörper, v.a. im Gyrus dentatus (c Pfeile). Die Astrozytenaktivierung fällt in dieser Hirnregion weniger stark aus als in den, vom Neuronenverlust betroffenen, cholinergen Kerngebieten. d-f Kontrolltier ohne Injektion. Keine Darstellung aktivierter Astrozyten. Nur wenige ruhende Zellen sind durch den GFAP-Antikörper markiert (f). Der Kasten in a, d begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe. CA Cornu ammonis, GD Gyrus dentatus, GDmol Stratum moleculare des Gyrus dentatus, GDgr Stratum granulare des Gyrus dentatus, H Hilus des Gyrus dentatus. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.1.3 Mikrogliaaktivierung nach Immunoläsion mit 192-IgG-SAP

Mikrogliaaktivierung in primären Läsionsgebieten des basalen Vorderhirns

Analog zur Abbildung der Astrozytenaktivität wird im folgenden Abschnitt die Aktivierung von Mikroglia in den beschriebenen Hirnregionen dargestellt. In den cholinergen Gebieten des basalen Vorderhirns ist bei den Läsionstieren eine Aktivierung von Mikroglia ipsilateral zur Schädigung zu erkennen (Abbildung 5).

Sowohl im medialen Septum, als auch im vertikalen und horizontalen Diagonalband sind aktivierte Mikroglia durch das Lektin GSA erkannt worden (Abb. 5 a-c). Kontralateral zur Toxin-Injektion zeigt sich auch eine leichte, jedoch im Vergleich zur geschädigten Hemisphäre wesentlich schwächer ausgeprägte Markierung von Mikroglia.

Bei dem ausgewählten Kontrolltier ohne Injektion ist keinerlei Aktivierung von Mikroglia-Zellen zu erkennen. Sowohl das mediale Septum als auch die beiden Teile des Diagonalbands zeigen keine aktivierten Mikroglia. Lediglich bei starker Vergrößerung kann man einige ruhende Mikroglia-Zellen erkennen. Es besteht kein Unterschied zwischen den beiden Hemisphären.

Im cholinergen Nbm zeigt sich spezifisch im Kerngebiet eine starke Mikrogliaaktivierung bei Versuchstieren mit Neuronenuntergang (Abbildung 5 g-i). Im umliegenden Gewebe zeigen sich keine aktivierten Mikrogliazellen, wie es bei einer unspezifischen Schädigung zu erwarten wäre. Die Mikroglia-Zellen im Nbm weisen die stärkste Aktivierung dieser Versuchsreihe auf. Anhand ihrer amöboiden Morphologie lässt sich vermuten, dass es sich um phagozytierende Mikroglia handelt. Die kontralaterale Seite präsentiert keine Veränderung der ruhenden Mikroglia im Bereich des cholinergen Kerngebiets (nicht gezeigt).

Im Vergleich zu den Kontrolltieren erkennt man deutliche Unterschiede. Die gezeigte Kontrolle ohne Injektion weist keinerlei Mikrogliaaktivierung im Kerngebiet des Nbm auf. Erneut sind in der starken Vergrößerung einige kleine, ruhende Mikroglia-Zellen, wie sie physiologisch im Hirnparenchym vorkommen, dargestellt. Bei den Kontrolltieren mit Injektion von Maus-IgG-SAP ergaben sich ebenfalls keine Hinweise auf eine gezielte Immunreaktion im Nbm.

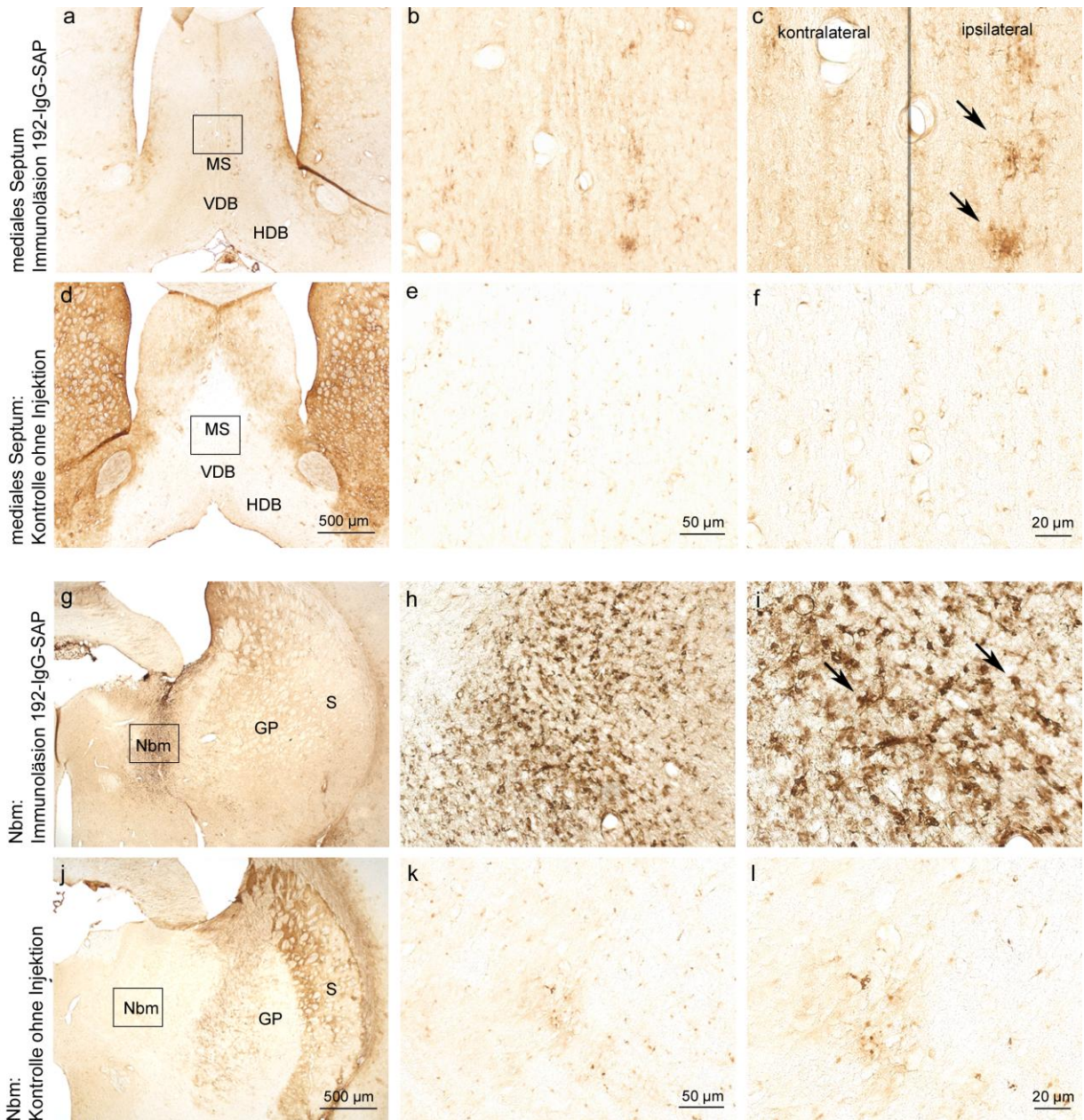


Abbildung 5: bio-GSA-Lektin-Histochemie: Mikrogliaaktivierung im basalen Vorderhirn. a-c Nachweis von aktivierten Mikroglia beim Immunoläsionstier. Ipsilaterale Aktivierung im medialen Septum, vertikalen und horizontalen Diagonalband (a). Vergrößerung eines Abschnittes aus dem medialen Septum (b, c). Einige aktivierte Mikroglia sind mit Pfeilen markiert (c). Kontralateral ist ebenfalls eine leichte Aktivierung von Mikroglia vorhanden. d-f Kontrolltier ohne Injektion. In allen drei cholinergen Gebieten dieser Schnittebene ist keine Aktivierung von Mikroglia zu verzeichnen. Es besteht kein Unterschied zwischen den beiden Seiten. g-i Darstellung der Mikrogliaaktivierung bei einer Ratte mit 192-IgG-SAP-Injektion. Im Kerngebiet des Nbm finden sich stark aktivierte, amöboide Mikroglia (i Pfeile). Es handelt sich dabei wahrscheinlich um phagozytierende Mikroglia. Im umliegenden Gewebe ist keine Mikrogliaaktivierung zu verzeichnen. j-l Beim Kontrolltier ohne Injektion ist keine Aktivierung von Mikroglia zu erkennen. Im Bereich des Nbm finden sich nur die physiologisch im Hirnparenchym vorkommenden, ruhenden Mikroglia-Zellen (l). Der Kasten in a, d, g, j begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe. MS mediales Septum, VDB vertikales Diagonalband, HDB horizontales Diagonalband, Nbm Nucleus basalis magnocellularis, GP Globus pallidus, S Striatum. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

Mikrogliaaktivierung im Hippocampus

In der untersuchten Projektionsregion, dem Hippocampus, zeigt sich vor allem im Gyrus dentatus eine Reaktion auf die Immunläsion beim 192-IgG-SAP-injizierten Tier (Abb. 6 a-c), wie bereits für die Astrozytenaktivierung dargestellt. Ähnlich wie im Abschnitt 4.1.2 für Astrozyten beschrieben, fällt auch die Aktivierung der Mikroglia im Projektionsgebiet weniger stark aus, als in den cholinergen Kernregionen. Es sind einige kleinere, aktivierte Mikrogliazellen zu erkennen. Im Vergleich zur kontralateralen Seite und zu den Kontrolltieren ergeben sich jedoch eindeutige Unterschiede.

Während bei der Kontrolle ohne Injektion keine Aktivierung von Mikrogliazellen zu erkennen ist (Abb. 6 d-f), zeigt sich beim Läsionstier doch zumindest eine leichte Reaktion, welche als spezifisch auf den Verlust der Terminalen cholinergischer Neurone zu werten ist. Die Kontrollen mit Injektion von Maus-IgG-SAP ergaben ebenfalls keine Hinweise auf eine Aktivierung von Mikroglia im Hippocampus.

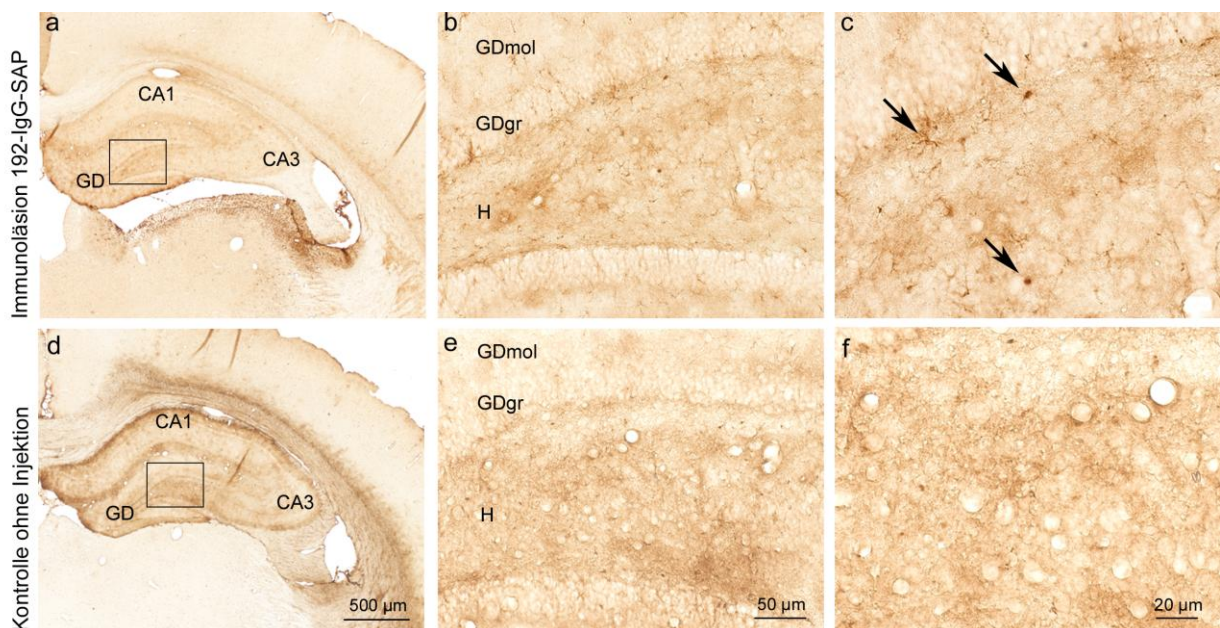


Abbildung 6: bio-GSA-Lektin-Histochemie: Mikroglia Darstellung im Hippocampus. Gezeigt ist die vollständige medio-temporale Ausdehnung des Hippocampus in der Übersichtsvergrößerung (a, d), sowie Ausschnitte aus dem Gyrus dentatus in den höheren Vergrößerungsstufen (b, c und e, f). a-c Mikroglia Darstellung einer Ratte mit cholinergem Neuronenverlust. Im Vergleich zu den Kontrolltieren ist eine leichte Aktivierung der Mikroglia zu sehen (c Pfeile). Diese aktivierten Gliazellen finden sich vor allem im Hilus des Gyrus dentatus. d-f Beim Kontrolltier ohne Injektion lassen sich in der hohen Vergrößerung nur wenige Mikroglia erkennen (f). Es hat keine Aktivierung der Zellen stattgefunden. Der Kasten in a, d begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe. CA Cornu ammonis, GD Gyrus dentatus, GDmol Stratum moleculare des Gyrus dentatus, GDgr Stratum granulare des Gyrus dentatus, H Hilus des Gyrus dentatus. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.1.4 Bildung einer typischen Glianarbe als Reaktion auf Neuronenschädigung

Die typische Reaktion des Gehirns, auf einen ausgedehnten Untergang von Nervenzellen mit Bildung einer Glianarbe zu antworten, soll anhand eines Beispiels aus der Region Nbm eines Immunoläsion-Versuchstieres präsentiert werden (Abbildung 7). Gegenübergestellt sind die GFAP-Färbung zur Abbildung der Astrozytenaktivierung und die bio-GSA-Färbung, welche die Mikrogliareaktion darstellt. Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln erwähnt, findet sich im Bereich des Kerngebietes eine starke Aktivierung von Mikroglia, während die rekrutierten Astrozyten einen Randwall bilden und so das geschädigte Gewebe vom gesunden Hirnparenchym abgrenzen. Dieser Vorgang wurde in verschiedenen Tieren und Hirnregionen beobachtet und stellt den üblichen Mechanismus nach erfolgtem Neuronenuntergang, z.B. durch Toxineinwirkung, wie in dieser Versuchsreihe, oder nach Ischämie, dar.

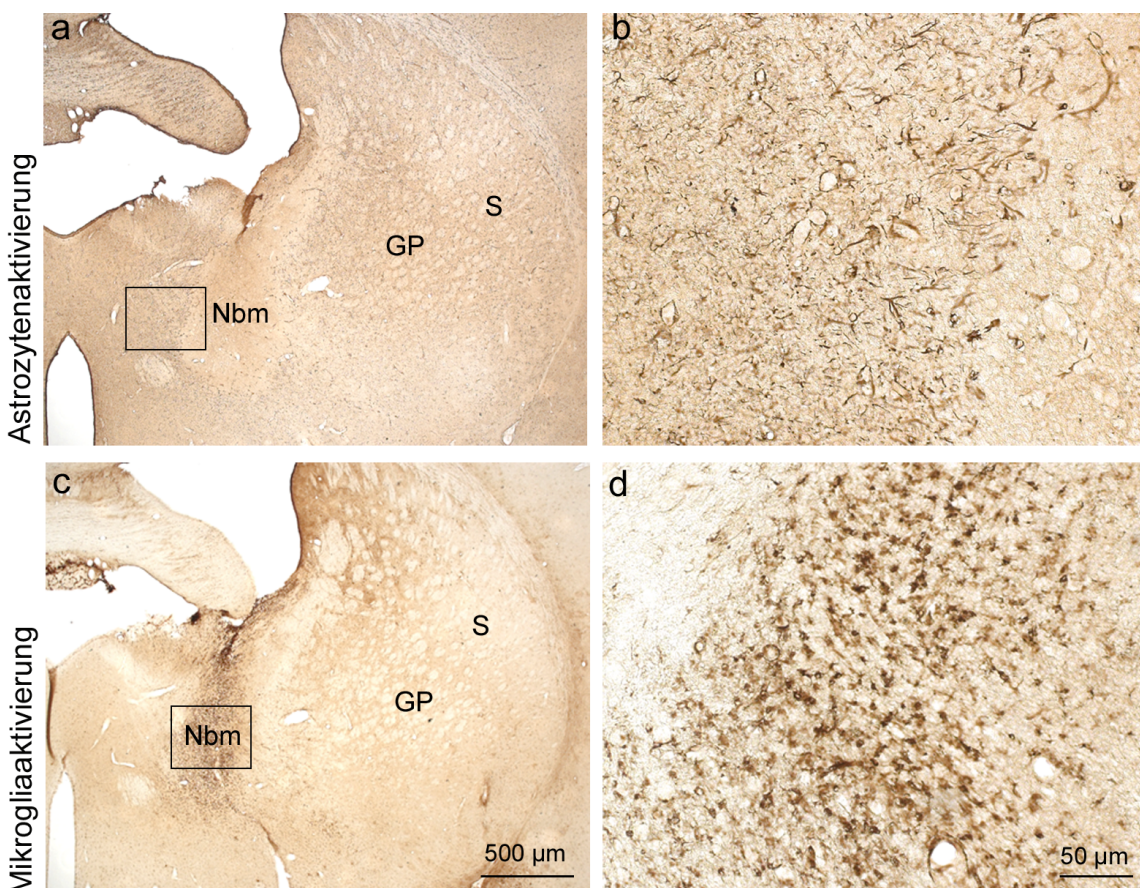


Abbildung 7: Bildung einer Glianarbe nach Injektion von 192-IgG-SAP am Beispiel des Nbm. a, b Typische Anordnung von Astrozyten am Rand eines Schädigungsgebietes zur Abschirmung des gesunden Hirnparenchyms. **c, d** Phagozytierende Mikroglia im Bereich des Nbm, dem Ort des Neuronenuntergangs, zur Beseitigung der anfallenden Zelltrümmer. *Nbm* Nucleus basalis magnocellularis, *GP* Globus pallidus, *S* Striatum. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.1.5 QC-Darstellung in lichtmikroskopischen Aufnahmen

Die immunhistochemische Markierung QC-positiver Zellen gab erste Hinweise auf eine Expression des untersuchten Enzyms nicht nur in Neuronen, wie bereits vielfach beschrieben, sondern auch in aktivierten Gliazellen. Als Beispiel sind in Abbildung 8 die Regionen Nbm und Hippocampus gezeigt. Man erkennt in beiden Gebieten, gemäß ihrem natürlichen Vorkommen, QC-exprimierende Neurone. Im Hippocampus finden sich diese v.a. im Stratum granulare und vereinzelt im Hilus des Gyrus dentatus.

Bereits in dieser lichtmikroskopischen Darstellung erhält man jedoch den Eindruck, dass nicht alle angefärbten Zellen neuronal sind (mit Pfeil gekennzeichnet in c, f). Man kann anhand der Morphologie dieser Zellen vermuten, dass es sich um aktivierte Astrozyten handelt. Dieser Eindruck lässt sich allerdings nur durch Co-Lokalisation mit Astrozyten- bzw. Mikroglia markern durch entsprechende Doppelmarkierungen verifizieren.

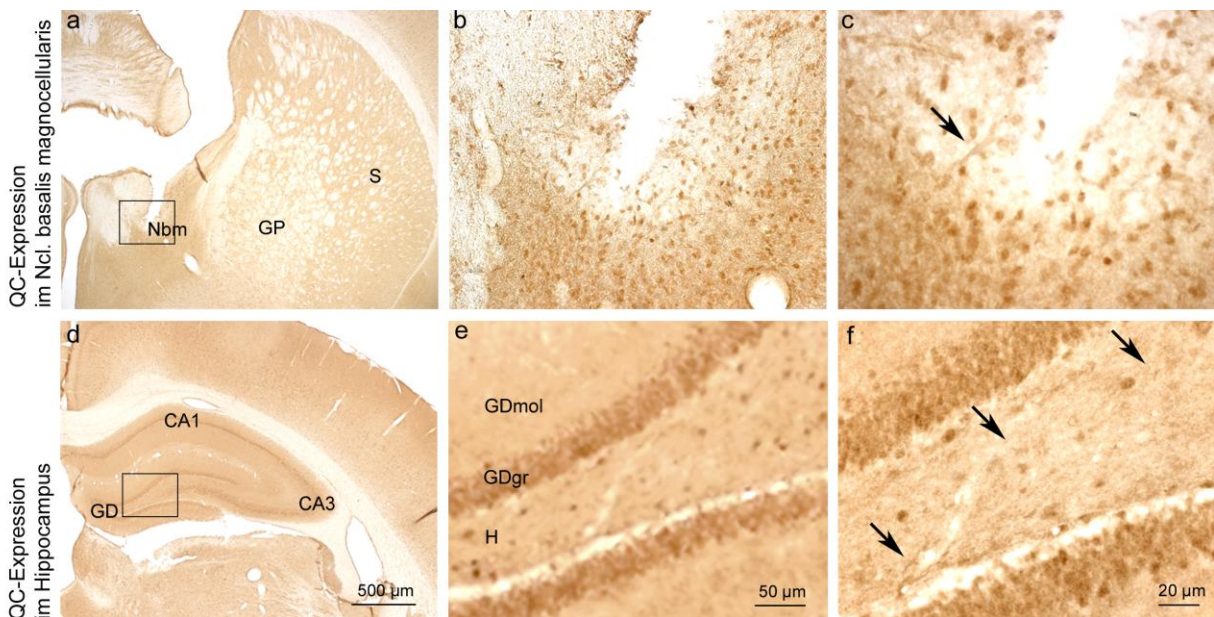


Abbildung 8: QC-Immunhistochemie: QC-Expression in Nbm (oben) und Hippocampus (unten). **a-c** Darstellung QC-exprimierender Zellen im cholinergen Kerngebiet Nbm eines 192-IgG-SAP-Versuchstieres in verschiedenen Vergrößerungsstufen mit vorwiegender Anfärbung von Neuronen. Gekennzeichnet ist eine Zelle, die morphologisch einem Astrozyten entspricht (**c** Pfeil). **d-f** QC-positive Zellen im Hippocampus einer Ratte mit cholinergem Neuronenverlust. Im Gyrus dentatus sind im Stratum granulare und vereinzelt auch im Hilus Neurone markiert. Es sind einige kleine gliäre Zellen im Hilus angefärbt (**f** Pfeile), bei denen es sich um Astrozyten oder aktivierte Mikroglia handeln könnte. Der Kasten in **a, d** begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe. *Nbm* Nucleus basalis magnocellularis, *GP* Globus pallidus, *S* Striatum, *CA* Cornu ammonis, *GD* Gyrus dentatus, *GDMol* Stratum moleculare des Gyrus dentatus, *GDgr* Stratum granulare des Gyrus dentatus, *H* Hilus des Gyrus dentatus. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.1.6 QC-Expression in Astrozyten und Mikroglia

Für die beiden cholinergen Kerngebiete mediales Septum und Nbm, sowie das Projektionsgebiet Hippocampus wurden Doppelmarkierungen von QC und Astrozyten- (GFAP) bzw. Mikroglia markern (bio-GSA) durchgeführt, welche im folgenden Abschnitt dargestellt sind (Abbildung 9). Mit Sternen sind jeweils beispielhafte Gliazellen gekennzeichnet.

QC-Expression in Gliazellen im basalen Vorderhirn

Das basale Vorderhirn, mit den hier ausgewählten Regionen mediales Septum und Nbm, wies in dieser Versuchsreihe als Ort des cholinergen Neuronenuntergangs eine großflächige Astrozytenaktivierung auf.

In Abbildung 9 a-c ist ein Ausschnitt mit einigen QC-exprimierenden (grün in a) Neuronen und nicht-neuronalen Zellen, sowie vielen aktivierten, stark verästelten Astrozyten (rot in b), welche durch den GFAP-Antikörper erkannt wurden, abgebildet. In Abb. 9 c sind durch die gelbe Färbung deutlich doppelt markierte Zellen zu erkennen (Beispiele mit Sternen gekennzeichnet). Es handelt sich um QC-exprimierende Astrozyten im medialen Septum.

In dieser Hirnregion zeigte die bio-GSA-Fluoreszenz-Färbung (rot) eine moderate Mikrogliaaktivierung (Abb. 9 e). In der dargestellten Übersichtsvergrößerung sind viele QC-haltige Neurone (grün) abgebildet (Abb. 9 d). Eine Doppelmarkierung mit Mikroglia ist in der Umgebung der Gefäße in der Mitte von Abb. 9 f anzunehmen (gelb). Die in Entfernung von den Gefäßen liegenden Mikroglia scheinen keine QC zu exprimieren.

Im Nbm verdeutlichte die Fluoreszenz-Darstellung ebenfalls eine starke Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen. Abbildung 9 g-i illustriert QC-positive Zellen (grün), sowie mehrere aktivierte Astrozyten (rot). Anhand der gelben Farbe in Abb. 9 i ist zu erkennen, dass neben einigen QC-positiven Neuronen auch QC-exprimierende, aktivierte Astrozyten abgebildet sind.

Im Nbm trat die stärkste Mikrogliaaktivierung dieser Versuchsreihe auf, was sich auch in der Doppelmarkierung bestätigte. Die amöboide Morphologie lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um phagozytierende Mikroglia handelt. In Abb. 9 j-l ist eine fast vollständige Überlagerung (gelb) der durch das GSA-Lektin markierten Mikroglia (rot) und der QC-exprimierenden Zellen (grün) zu verzeichnen. Im

phagozytierenden Stadium der Mikrogliaaktivierung könnte demnach eine QC-Synthese in Mikroglia stattfinden.

QC-Doppelmarkierung in Astrozyten und Mikroglia im Hippocampus

Im cholinergen Projektionsgebiet Hippocampus zeigte sich in der Fluoreszenzdarstellung ähnlich den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Aufnahmen eine schwächere Gliaktivierung als in den cholinergen Kerngebieten. Die dargestellten Astrozyten weisen feinere Fortsätze auf als die aktivierten Astrozyten der anderen untersuchten Regionen. Eine flächenhafte Mikrogliaaktivierung oder phagozytierende Mikrogliazellen waren nicht nachweisbar. Abbildung 9 veranschaulicht jedoch in den Bildern m-o, dass auch bei schwächerer Aktivierung bereits deutlich mit QC doppelt markierte Astrozyten (gelb in o) vorhanden sind. In dieser hohen Vergrößerung ist die QC bis in die Astrozytenfortsätze nachweisbar. Die Aufnahme der gezeigten Bilder erfolgte im Hilus des Gyrus dentatus.

Die Aktivierung von Mikroglia fiel im Hippocampus nur schwach aus. Eine so deutliche Doppelmarkierung wie im Nbm ist hier nicht zu erkennen. Es liegen nur wenige aktivierte Mikroglia (rot) vor. Eine leichte Expression von QC (grün) in Mikroglia scheint jedoch vorhanden zu sein (Abb. 9 p-r). Neben einem vom QC-Antikörper markierten Neuron am Oberrand des Bildes, liegt eine leichte Doppelmarkierung (gelb) im Bereich der dargestellten ramifizierten Mikrogliazelle vor.

In den dargestellten Ergebnissen bestätigt sich der Eindruck einer gliären QC-Expression, der sich bereits in der QC-Immunhistochemie mit DAB-Färbung ergab (siehe Abbildung 8). In den beiden untersuchten cholinergen Kerngebieten, sowie dem ausgewählten Projektionsgebiet war nach cholinergem Immunoläsion eine QC-Expression in aktivierten Astrozyten nachweisbar. Die eindeutige Darstellung einer QC-Synthese in Mikrogliazellen erfolgte in amöboiden, phagozytierenden Mikrogliazellen im Nbm. In den beiden Gebieten mit leichter Mikrogliaaktivierung zeigte sich nur eine schwache Doppelmarkierung mit QC.

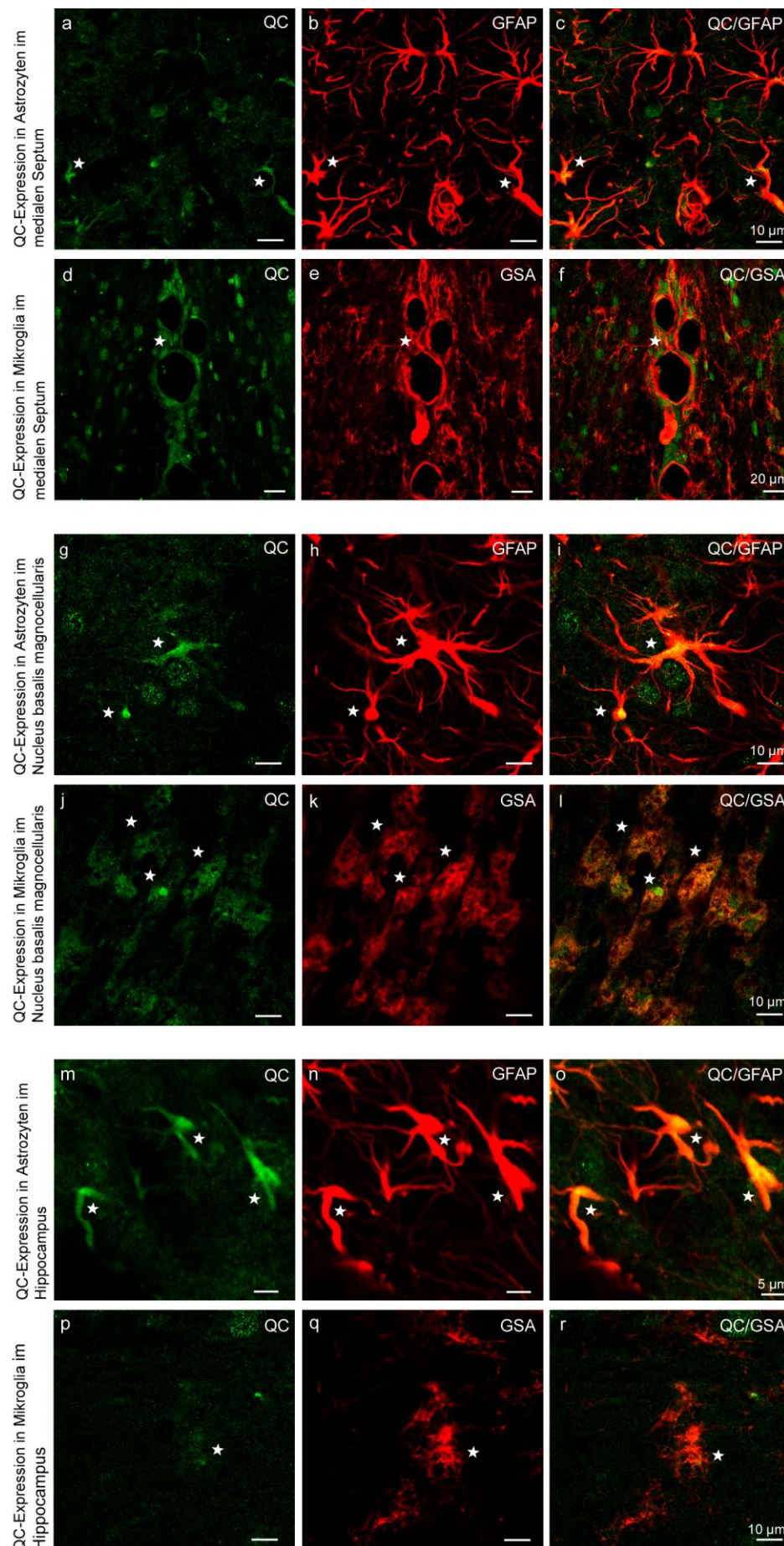


Abbildung 9: QC-Expression in Astrozyten und Mikrogliazellen.

a-c QC-Expression (grün) und Astrozyten (rot) im medialen Septum. An der gelben Färbung in **c** erkennt man die Co-Lokalisation von QC in Astrozyten (Beispiele sind mit Sternen gekennzeichnet).

d-f QC positive Zellen (grün) und Mikroglia (rot) im medialen Septum. Nur in unmittelbarer Umgebung der Gefäße sind schwach doppelt markierte (gelb) Mikroglia zu erkennen (Stern).

g-i Doppelmarkierung von QC-exprimierenden (grün) Astrozyten (rot) im Nucleus basalis magnocellularis. Anhand der Gelbfärbung erkennt man eine deutliche Überlagerung der mit Stern markierten Astrozyten und einer Expression von QC bis in die dickeren Astrozytenfortsätze. Es sind auch einige physiologisch vorkommende QC-exprimierende Neurone angefärbt (**g**).

j-l Darstellung von QC-Expression (grün) in Überlagerung (gelb) mit amöboiden Mikrogliazellen (rot). In diesem Aktivierungsstadium der Mikroglia liegt eine fast vollständige Übereinstimmung von QC und Mikroglia vor (siehe z.B. Sterne).

m-o Markierung von QC (grün) und Astrozyten (rot) im Hippocampus. Die dargestellten Astrozyten sind in diesem Projektionsgebiet kleiner als in den cholinergen Kerngebieten. Dennoch lässt sich auch in diesen eine deutliche Doppelmarkierung (gelb) von QC-Expression und Astrozyten erkennen (Beispiele sind mit Stern gekennzeichnet).

p-r QC-Expression (grün) und Mikroglia (rot) im Projektionsgebiet Hippocampus. Die Aktivierung von Mikroglia fiel in diesem Gebiet wesentlich schwächer aus, als in den untersuchten cholinergen Kerngebieten. Eine schwache Überlagerung (gelb) einer aktivierten Mikrogliazelle (Stern) und der QC-Expression ist in **r** zu erkennen.

Die Maßstab balken gelten jeweils für die komplette Zeile.

4.2 Ischämie durch Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO)

Als zweites Schädigungsmodell wurde ein transienter Verschluss der Arteria cerebri media (ACM) im Gehirn von Mäusen gewählt, um eine weitere Form der Gliazellaktivierung durch Ischämie zu simulieren. Neun Monate alte Mäuse wurden einer 30-minütigen mechanischen Okklusion der ACM mit anschließender Reperfusion unterzogen. Zwei bzw. sieben Tage nach erfolgter Operation wurde das Hirngewebe entnommen und auf Ischämie-Zeichen, Astrozyten- und Mikrogliaaktivierung, sowie Expression der QC untersucht. Erneut war es Ziel der Experimente, in zwei verschiedenen Hirnregionen nach einem Ischämieereignis, die Expression der QC in aktivierten Gliazellen zu untersuchen. Das Gewebe wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten analysiert, um einen zeitlichen Verlauf der Gliaaktivierung darzustellen. Es wurden folgende Regionen ausgewählt: das Striatum als direkt dem Ischämiekern zugehörige Hirnregion (0,62-0,74 mm AP von Bregma) und der Hippocampus (-1,7 bis -1,94 mm AP von Bregma), da er an den Funktionen Lernen und Gedächtnis beteiligt ist und für die Betrachtung der QC in der Alzheimer-Pathologie eine wichtige Rolle spielt. Der Hippocampus liegt nicht im Versorgungsgebiet der ACM, ist jedoch häufig durch sekundäre Schädigungen nach transientem Verschluss der Arterie von einem Neuronenverlust und einer Aktivierung von Gliazellen nach Ischämie betroffen (Kanemitsu et al. 2002). In den folgenden Abschnitten wird zunächst für das Striatum, anschließend für den Hippocampus eine Gegenüberstellung verschiedener immunhistochemischer Färbungen zu den beiden Untersuchungszeitpunkten präsentiert. Die Markierung Hitzeschock- Protein 27 (HSP 27)-positiver Zellen sollte das Ausmaß des durch Ischämie geschädigten Gewebes verdeutlichen (Popp et al. 2009). Die Gliaaktivierung wurde in einer GFAP- (Astrozyten) bzw. Iba-1- (Mikroglia) Immunhistochemie veranschaulicht. Die lichtmikroskopische Darstellung von QC sollte einen ersten Anhalt für eine Expression in Gliazellen geben. Da diese Darstellungsweise aber keine eindeutige Zuordnung zu bestimmten Zelltypen zulässt, sollten Fluoreszenz-Doppelmarkierungen die Expression in Astrozyten bzw. Mikroglia, sowie die Ko-Expression von HSP 27 und QC demonstrieren.

Als Kontrolle diente eine Maus ohne MCAO, bei der sich kein Anhalt für eine HSP 27-Hochregulation, Astrozyten- oder Mikrogliaaktivierung zeigte (Bilder nicht gezeigt).

4.2.1 Untersuchung des Striatums zwei Tage nach Okklusion der ACM

Das Striatum wurde als erstes Gebiet für die Beobachtung einer Gliazell-Reaktion nach Ischämie gewählt, da es von der ACM versorgt wird und seine Sauerstoffzufuhr somit durch den Arterienverschluss für 30 Minuten unterbunden war.

In Abbildung 48 sind die Expression von HSP 27 als Ischämiemarker (Abb. 10 a-c), die Astrozyten- (Abb. 10 d-f) und Mikrogliaaktivierung (Abb. 10 g-i), sowie die Expression von QC im Striatum (Abb. 10 j-l), zwei Tage nach Ischämie dargestellt.

Bereits nach dieser kurzen Zeitspanne ist eine deutliche Expression von HSP 27 im Bereich des Striatums und des angrenzenden Neocortex (Abb. 10 a) zu verzeichnen. Dieser frühe Ischämie-Marker, welcher vor allem in Astrozyten nachzuweisen ist, gibt einen Anhalt dafür, welches Areal von der Gewebeschädigung durch eine 30-minütige Ischämie betroffen ist. In Abb. 10 c sind einige kleinere Gliazellen mit Pfeilen gekennzeichnet. Es handelt sich wahrscheinlich um erste aktivierte Astrozyten, welche das HSP 27 exprimieren. Im umliegenden Gewebe und dem kontralateralen Striatum, sowie bei dem nicht-operierten Kontrolltier, kam es zu einer Markierung von Endothelzellen, welche typischerweise von dem HSP 27-Antikörper im ungeschädigten Gewebe erkannt werden (nicht gezeigt).

Die Aktivierung von Astrozyten nach Ischämie fiel zu diesem Untersuchungszeitpunkt relativ gering aus. In Abb. 10 d zeichnet sich jedoch bereits eine dezente Markierung von GFAP-positiven Zellen im Infarktgebiet ab. Die Pfeile in Abb. 10 f präsentieren einige kleinere, aktivierte Astrozyten im Striatum.

In der Darstellung der Iba1-Immunhistochemie ist bereits zu diesem frühen Zeitpunkt nach Ischämie eine deutliche Aktivierung von Mikrogliazellen zu erkennen. Die aktivierten Zellen sind im gesamten Striatum markiert, jedoch zeichnet sich eine Zone besonders dicht liegender Mikroglia um die Begrenzung des Kerngebietes ab (Abb. 10 g). In Abb. 10 i sind beispielhaft zwei aktivierte Mikroglia durch Pfeile gekennzeichnet.

In Abbildung 10 j-l ist die Expression von QC im Striatum dargestellt. Es zeigen sich vereinzelte kleine, QC-positive Zellen, bei denen es sich um aktivierte Astrozyten handeln könnte (Pfeilspitzen in l).

Für die gezeigten immunhistochemischen Färbungen ergaben sich auf der kontralateralen Seite keine Hinweise auf eine Aktivierungsreaktion (nicht gezeigt).

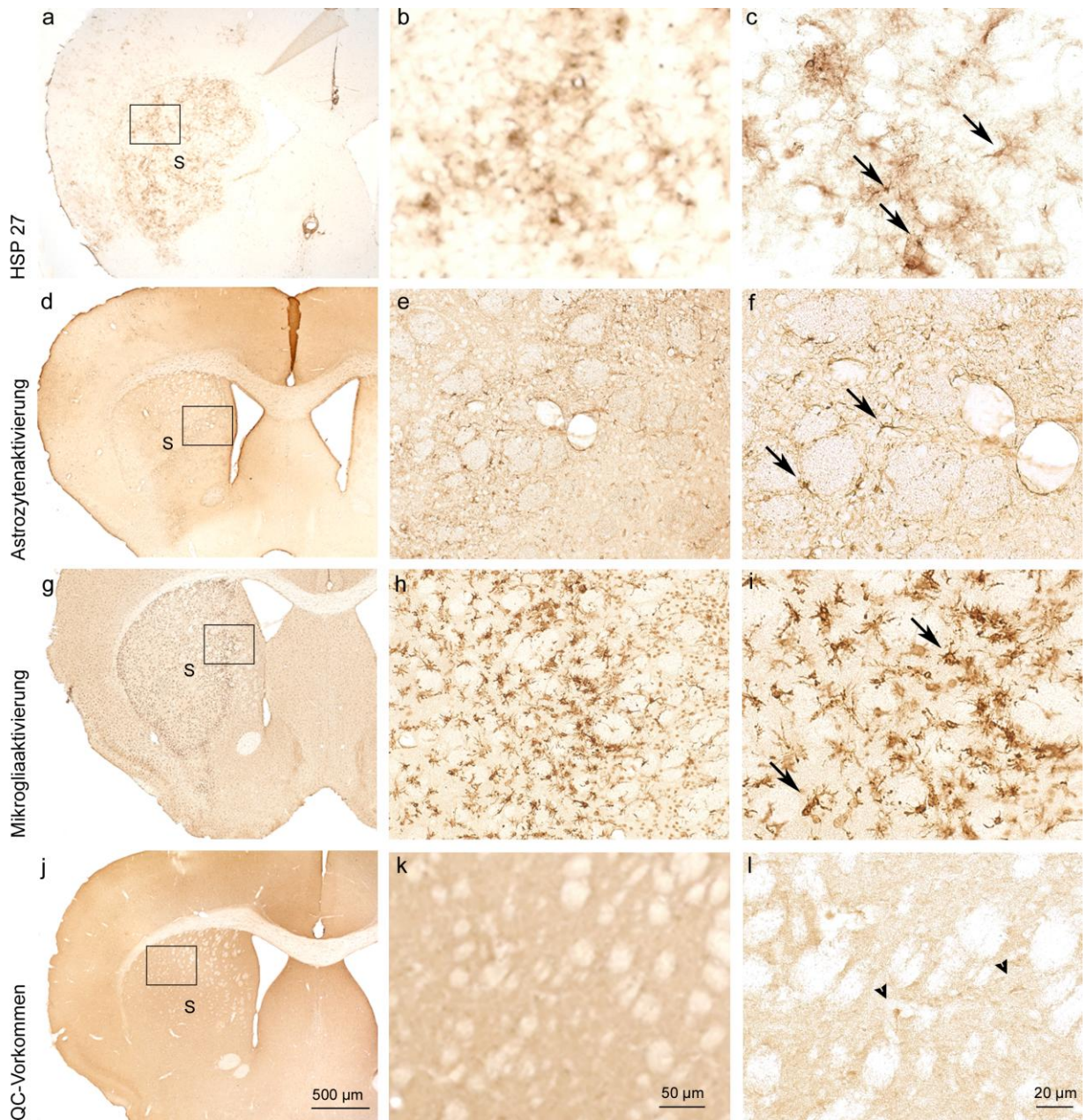


Abbildung 10: Striatum ipsilateral, 2 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM. a-c Die HSP 27-exprimierenden Zellen markieren das von der Ischämie betroffene Hirnparenchym, u.a. das Striatum, eines der von der ACM versorgten Kerngebiete. Mit Pfeilen in c gekennzeichnet sind einige Astrozyten, welche HSP 27 exprimieren. d-f Astrozytenaktivierung im Bereich des Striatums. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt sind kaum aktivierte Astrozyten im Striatum nachweisbar. In f sind einige Astrozyten mit Pfeilen markiert. g-i Iba1-Immunhistochemie. Bereits nach zwei Tagen sind deutlich aktivierte Mikroglia im Bereich des Infarktes im Striatum zu erkennen. Besonders viele sind am Rand des Kerngebiets angeordnet. In i sind beispielhaft zwei aktivierte Mikrogliazellen mit Pfeilen gekennzeichnet. j-l QC-Expression im Striatum. Die Pfeile in l präsentieren vereinzelte, kleine QC-exprimierende Zellen. Dabei könnte es sich um aktivierte Astrozyten handeln. Der Kasten in a, d, g, j begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe (b, e, h, k). S Striatum. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.2.2 Untersuchung des Striatums sieben Tage nach Okklusion der ACM

In Abbildung 11 sind die Untersuchungsergebnisse für das Striatum sieben Tage nach 30-minütiger Unterbindung der Blutversorgung dargestellt. Für keine der gezeigten Färbungen ergaben sich Hinweise auf eine spezifische Reaktion im kontralateralen Striatum (nicht gezeigt).

Es ist eine stärker ausgeprägte Expression von HSP 27 als nach zwei Tagen in Abb. 11 a-c zu erkennen. Zu diesem späteren Zeitpunkt nach Ischämie sind in Abb. 11 c viele aktivierte Astrozyten markiert, welche HSP 27 synthetisieren (Pfeile).

Auch die Astrozytenaktivierung (Abb. 11 d-f) ist im Vergleich zum zweiten Tag nach Ischämie deutlich gesteigert. Bereits in der Übersichtsaufnahme (Abb. 11 d) erkennt man einen dunklen Randwall um das ischämische Gebiet, welcher von GFAP-positiven, aktivierten Astrozyten gebildet wird. In der Vergrößerung zeigen sich verteilt im striatalen Gewebe viele aktivierte Astrozyten. Beispiele sind in Abb. 11 f mit Pfeilen markiert.

Die Iba1-Immunhistochemie (Abb. 11 g-i) ergab das Bild einer starken, flächenhaften Mikrogliaaktivierung über die gesamte sichtbare Ausdehnung des Striatums, wie an der dunklen Färbung des Kerngebietes in Abb. 11 g zu erkennen ist. Die Vergrößerungen zeigen, dass es sich um stark verzweigte, aktivierte Mikrogliazellen handelt, die sich gleichmäßig im ischämischen Gewebe verteilen (z.B. Pfeile in Abb. 11 i).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen am zweiten postischämischen Tag ergibt die QC-Immunhistochemie am siebten Tag ein völlig anderes Bild (Abb. 11 j-l). Es zeigen sich im Striatum eine große Anzahl QC-exprimierender Zellen (Abb. 11 k und l). In der Übersichtsaufnahme erhält man den Eindruck, dass die QC-positiven Zellen eine ähnliche Verteilung zeigen, wie die Astrozyten in Abb. 11 d. Bei genauerer Betrachtung der QC-synthetisierenden Zellen in der Vergrößerung (Abb. 11 l), scheint es sich um gliäre Zellen zu handeln. Die markierten Zellen ähneln mit ihren vielen Zellausläufern den in Abb. 11 f dargestellten Astrozyten. Da dieses aber rein morphologisch nicht abschließend geklärt werden kann, wurden immunzytochemische Fluoreszenz-Doppelmarkierungen von QC und GFAP durchgeführt. Zum Vergleich wurde bei der nicht-operierten Kontroll-Maus eine QC-Immunhistochemie durchgeführt. Bei dieser Kontrolle zeigten sich keine Hinweise auf QC-exprimierende Zellen im Striatum (nicht gezeigt).

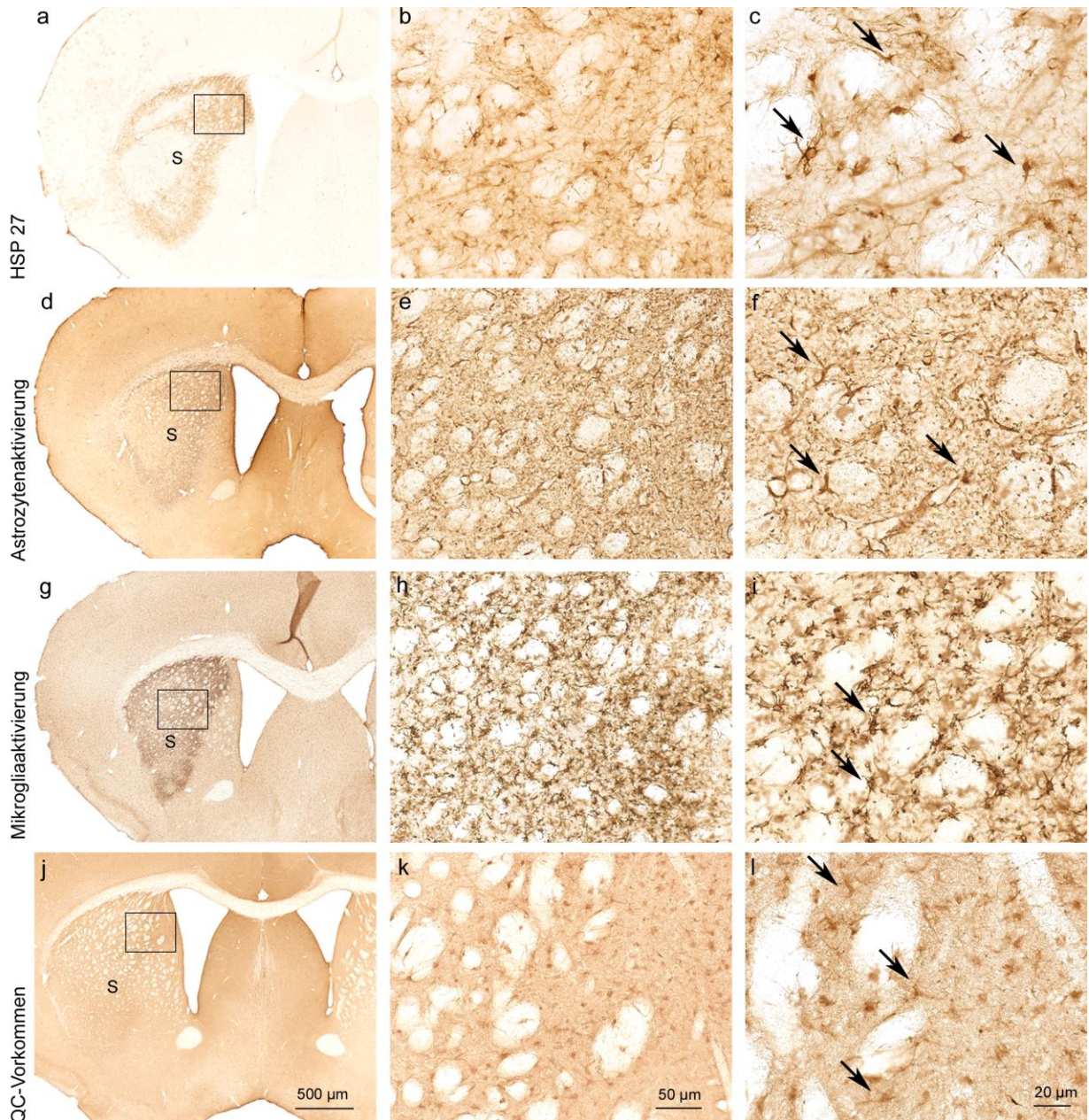


Abbildung 11: Striatum ipsilateral, 7 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM. a-c HSP 27-Immunhistochemie. Es ist im Vergleich zum früheren Untersuchungszeitpunkt eine deutliche Hochregulation des HSP im ischämischen Striatum zu erkennen. In c sind einige HSP 27-positive Zellen markiert, wobei es sich morphologisch am ehesten um Astrozyten handelt (Pfeile). d-f GFAP-Immunhistochemie. In d ist eine starke Aktivierung von Astrozyten zu erkennen, welche einen Randwall um das geschädigte Gebiet bilden. Einige beispielhafte Zellen sind in f mit Pfeilen gekennzeichnet. g-i Iba1-Immunhistochemie. Es ist eine gleichmäßig verteilte Mikrogliaaktivierung im gesamten Striatum zu verzeichnen. Es handelt sich um rundliche, stark verzweigte Mikroglia (Beispiele durch Pfeile in i markiert). j-l QC-Immunhistochemie. Im Vergleich zum früheren Zeitpunkt ist nun eine deutliche Steigerung der QC-exprimierenden Zellen im Ischämiegebiet zu erkennen. Es sind in der Vergrößerung (l) gliäre Zellen (Pfeile) zu sehen, welche vom QC-Antikörper erkannt wurden. Diese entsprechen morphologisch am ehesten den in f gezeigten aktivierten Astrozyten. Es ergibt sich so die Vermutung, dass QC nach Ischämie vor allem in Astrozyten exprimiert wird. Der Kasten in a, d, g, j begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe (b, e, h, k). S Striatum. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.2.1 Untersuchung des Hippocampus zwei Tage nach Okklusion der ACM

Das zweite Untersuchungsgebiet, der Hippocampus, wird nicht von der ACM, sondern von der Arteria cerebri posterior versorgt und liegt somit nicht im direkt von der Okklusion betroffenen Hirnareal. Er ist jedoch häufig sekundär von einer Okklusion der ACM betroffen (Kanemitsu et al. 2002) und deshalb interessant für diese Studie. Da der Hippocampus für die Untersuchung der Alzheimer-Pathologie eine zentrale Rolle spielt, wurde er als zweite Hirnregion für diese Versuchsreihe ausgewählt.

In Abbildung 12 a-c zeigt die HSP 27-Immunhistochemie zu diesem frühen Zeitpunkt nach Ischämie bereits eine Expression dieses Hitze-Schock-Proteins im Hippocampus, v.a. im Gyrus dentatus. Andere abgebildete Hirnareale, wie der kontralaterale Hippocampus oder der Thalamus, zeigen keine gesteigerte HSP 27-Synthese. Lediglich Endothelzellen werden im nicht betroffenen Gewebe vom Antikörper markiert (siehe beispielhaft Pfeil in Abb. 12 b). Im Gyrus dentatus ist in Abb. 12 c zu erkennen, dass das HSP 27 sowohl von Neuronen (Pfeilspitzen) als auch aktivierten Astrozyten (Pfeile) exprimiert wird. Beim Kontrolltier ohne ACM erfolgte keine Hochregulation der HSP 27-Synthese im Hippocampus, lediglich Endothelzellen wurden markiert (nicht gezeigt).

Die GFAP-Immunhistochemie (Abb. 12 d-f) zeigt eine einseitige Aktivierung von Astrozyten ipsilateral zur Okklusion der ACM, während die kontralaterale Seite keine Hinweise auf eine Aktivierung von Astrozyten gibt. In Abb. 12 f sind einige aktivierte Astrozyten im Gyrus dentatus mit Pfeilen markiert.

Auch eine Aktivierung von Mikrogliazellen kann im Hippocampus nach zwei Tagen bereits beobachtet werden (Abb. 12 g-i). Im Vergleich zur Gegenseite finden sich nur ipsilateral aktivierte Mikroglia, v.a. im Gyrus dentatus. In Abb. 12 i sind beispielhaft zwei stark verzweigte, aktivierte Mikroglia durch Pfeile aufgezeigt.

Die QC-Immunhistochemie (Abb. 12 j-l) präsentiert das physiologische Bild der QC-Expression im Hippocampus. Das Enzym findet sich vor allem in Neuronen im Hilus des Gyrus dentatus. Es ergibt sich jedoch zu diesem frühen Zeitpunkt nach Ischämie kein eindeutiger Hinweis auf die Induktion einer gliären Expression der QC im Gyrus dentatus. Eine ähnliche Verteilung der QC-Expression zeigte sich beim Kontrolltier ohne Operation (nicht gezeigt).

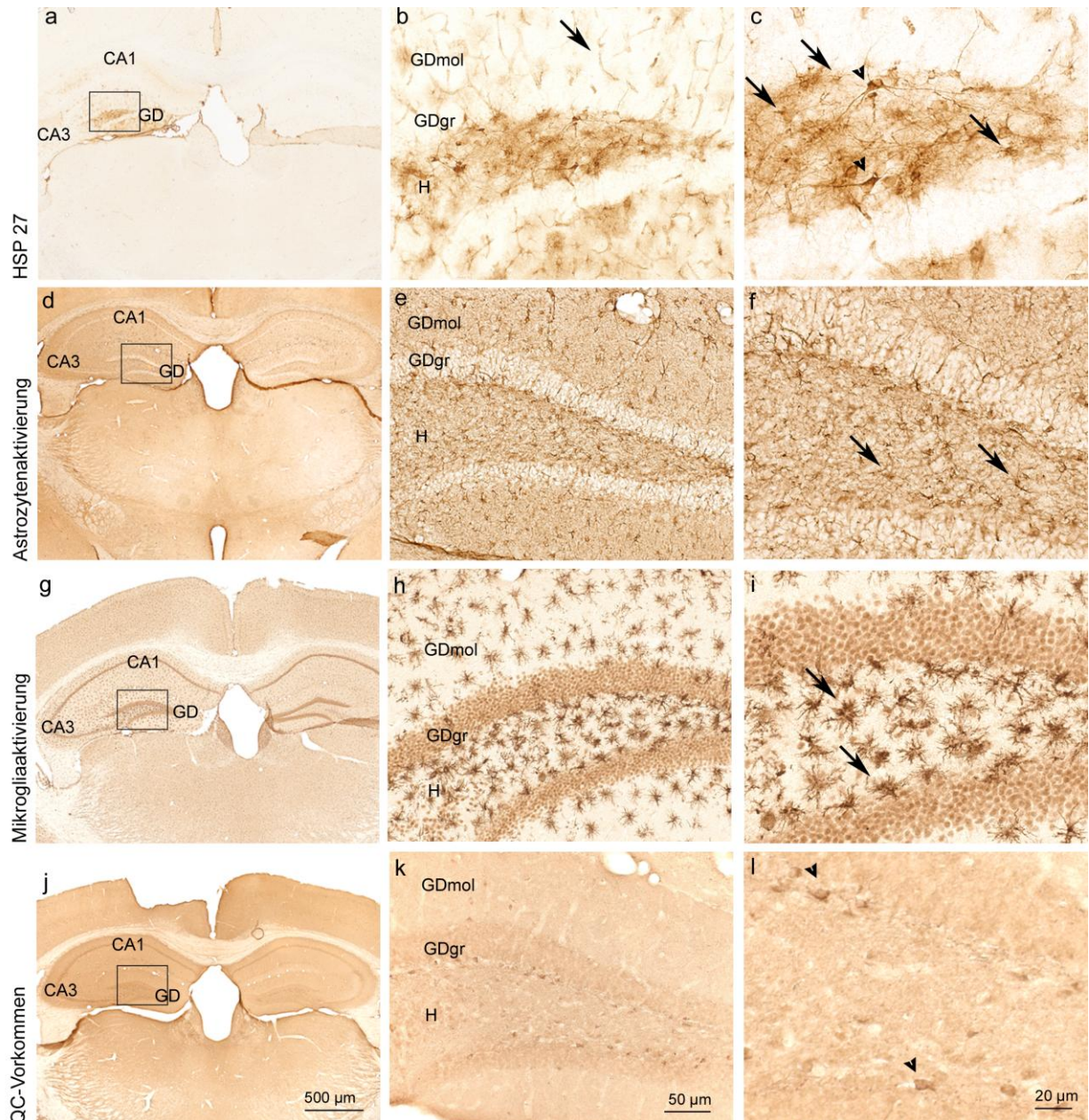


Abbildung 12: Hippocampus ipsilateral, 2 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM. a-c HSP 27 Immunhistochemie. Bereits zwei Tage post Ischämie ist eine Hochregulation von HSP 27 im Gyrus dentatus des ipsilateralen Hippocampus zu beobachten. Im umliegenden, von der Ischämie unbeeinflussten Gewebe werden nur HSP 27-exprimierende Endothelzellen vom Antikörper erkannt (Pfeil in b). In c ist zu sehen, dass sowohl Neurone (Pfeilspitzen) als auch Astrozyten (Pfeile) das HSP 27 synthetisieren. d-f GFAP-Immunhistochemie. Im Hippocampus, v.a. im Gyrus dentatus ipsilateral der Arterienokklusion ist eine Aktivierung von Astrozyten zu verzeichnen. In f sind zwei aktivierte Astrozyten im Hilus des Gyrus dentatus markiert (Pfeile). g-i Iba1-Immunhistochemie. Markierung vieler aktivierter Mikroglia im ipsilateralen Hippocampus, besonders im Gyrus dentatus. In i zeigen die Pfeile auf zwei aktivierte Mikrogliazellen im Hilus des Gyrus dentatus. Die kontralaterale Seite zeigt keine Anzeichen einer Mikrogliaaktivierung. j-l QC-Immunhistochemie. Es ergibt sich das Bild der physiologischen QC-Expression v.a. in Neuronen im Randbereich des Hilus des Gyrus dentatus (Pfeile in l). Der Kasten in a, d, g, j begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe (b, e, h, k). CA Cornu ammonis, GD Gyrus dentatus, GDmol Stratum moleculare des Gyrus dentatus, GDgr Stratum granulare des Gyrus dentatus, H Hilus des Gyrus dentatus. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.2.2 Untersuchung des Hippocampus sieben Tage nach Okklusion der ACM

Die Ergebnisse für den Hippocampus, sieben Tage nach Verschluss der ACM, sind in Abbildung 13 dargestellt. Im Vergleich ist jeweils der kontralaterale Hippocampus mit abgebildet, welcher sich von der Ischämie unbeeinflusst zeigt.

Die Hochregulation des HSP 27 ist in Abbildung 13 a-c zu sehen. Im zeitlichen Vergleich zu der Synthese am zweiten postischämischen Tag, stellt sich nun eine starke Expression im gesamten Hippocampus dar. Ein Ausschnitt aus dem Gyrus dentatus ist in der Vergrößerung aufgeführt. Man erkennt deutlich angefärbte, aktivierte Astrozyten (Pfeile in Abb. 13 c), welche das HSP 27 synthetisieren. Auch andere Regionen zeigen in dieser Schnittebene eine HSP 27-Expression z.B. Anteile des Thalamus und der angrenzende Cortex (nicht gezeigt).

Die Astrozytenaktivierung im Hippocampus ist in Abb. 13 d-f präsentiert. Nach sieben Tagen ist diese deutlich fortgeschritten. Es sind viele aktivierte Astrozyten zu erkennen. Ein Ausschnitt aus dem Gyrus dentatus ist vergrößert dargestellt, welcher eine Vielzahl aktivierter Astrozyten aufweist (z.B. Pfeile in Abb. 13 f).

Die Iba1-Immunhistochemie zeigt in Abbildung 13 g-i im Vergleich zum zweiten postischämischen Tag nur eine leichte Steigerung der Mikrogliaaktivierung. Es sind weiterhin viele aktivierte Mikrogliazellen im ipsilateralen Hippocampus zu erkennen.

Im Bereich des Hippocampus ipsilateral der ACM-Okklusion kommt es sieben Tage nach Ischämie zu einer vermehrten Expression von QC. Vergleicht man diese mit der Enzymproduktion zwei Tage nach Ischämie (Abbildung 12 j-l), werden nun neben Neuronen (Pfeilspitzen Abbildung 13 l) auch gliäre Zellen (Pfeile in Abb. 13 l) vom QC-Antikörper markiert. Während die Neurone des Randbereichs des Hilus (Pfeilspitzen) bereits nach zwei Tagen zu sehen waren, erscheinen nun zusätzlich viele gliäre QC-immunreaktive Zellen im Hippocampus. Diese Zellen wirken astrozytär, sie ähneln morphologisch den in Abb. 13 f dargestellten Astrozyten. Da eine Unterscheidung anhand der Morphologie in dieser Immunhistochemie jedoch zu ungenau ist und man nur Vermutungen anstellen kann, sollen die folgenden Abschnitte, durch Darstellung der Doppelmarkierungen in verschiedenen Fluoreszenz-Färbungen, das Vorkommen von QC in Gliazellen untersuchen.

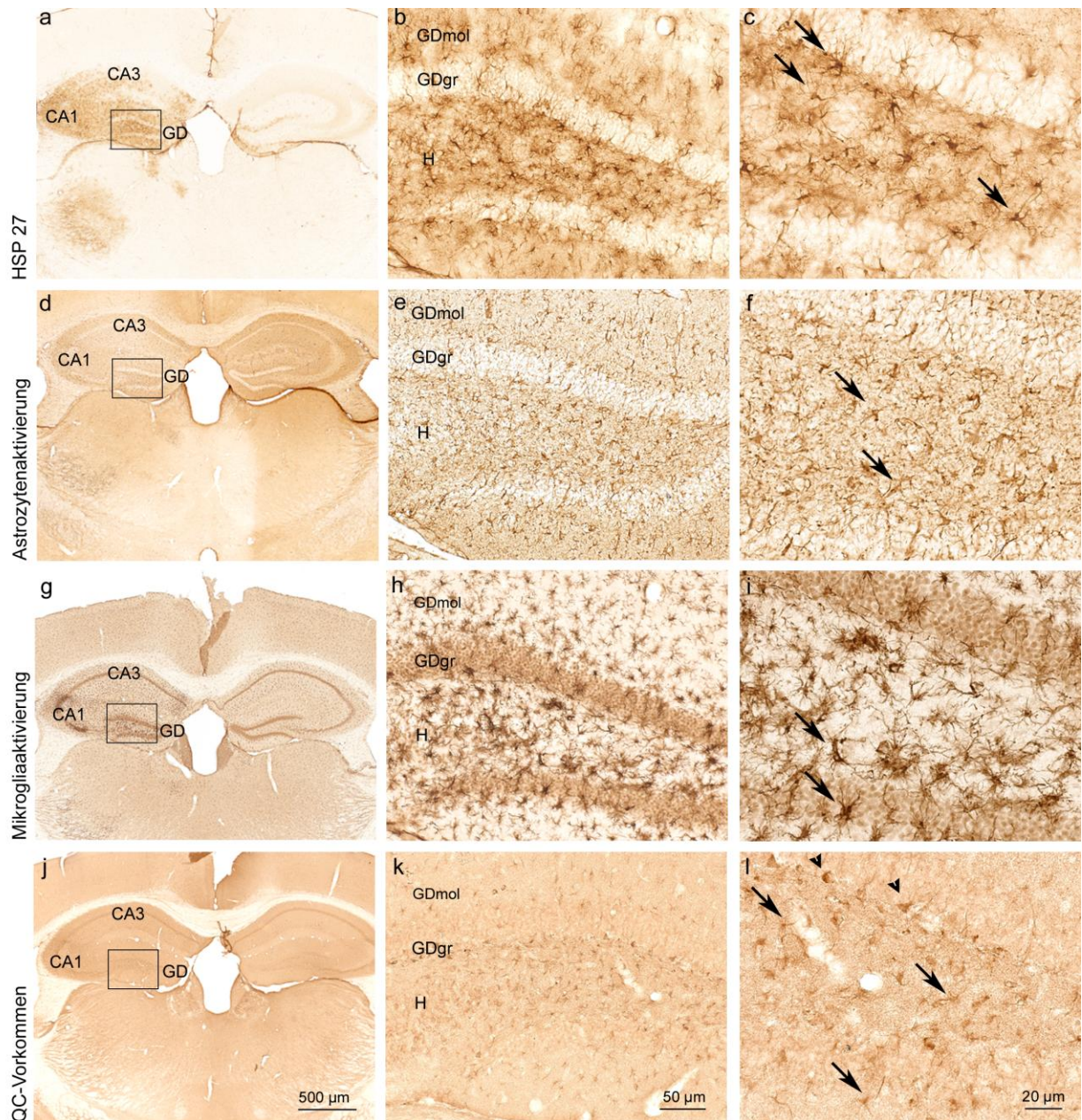


Abbildung 13: Hippocampus ipsilateral, 7 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM. a-c HSP 27-Immunhistochemie. Starke Hochregulierung des HSP 27 im ipsilateralen Hippocampus. In einem Ausschnitt aus dem Gyrus dentatus (c) erkennt man viele aktivierte Astrozyten (Pfeile), welche das Protein exprimieren. d-f GFAP-Immunhistochemie. Die Aktivierung von Astrozyten im Hippocampus ist im Vergleich zum zweiten postschämischen Tag weiter fortgeschritten. Man erkennt eine große Anzahl aktivierter Astrozyten in diesem Ausschnitt des Gyrus dentatus (Pfeile in f). g-i Iba1-Immunhistochemie. Die Bilder zeigen eine leicht fortgeschrittene Mikrogliaaktivierung im Vergleich zum früheren Untersuchungszeitpunkt. Im Gyrus dentatus sind einige aktivierte Mikroglia mit Pfeilen gekennzeichnet (in i). j-l QC-Immunhistochemie. Am siebten postschämischen Tag erkennt man im Hippocampus eine deutlich gesteigerte Anzahl QC-exprimierender Zellen im Vergleich zum zweiten Tag. Neben den physiologisch vorkommenden QC-positiven Neuronen (Pfeilspitzen), sind nun auch gliäre Zellen markiert (Pfeile in l). Es könnte sich hierbei um aktivierte Astrozyten handeln. Der Kasten in a, d, g, j begrenzt das Areal für die nächste Vergrößerungsstufe (b, e, h, k). CA Cornu ammonis, GD Gyrus dentatus, GDmol Stratum moleculare des Gyrus dentatus, GDgr Stratum granulare des Gyrus dentatus, H Hilus des Gyrus dentatus. Die Maßstabsbalken gelten jeweils für die komplette Spalte.

4.2.3 QC-Expression in Astrozyten bzw. Mikroglia und Ko-Expression von QC mit HSP 27

Zwei Tage nach Ischämie ergaben sich in den lichtmikroskopischen Aufnahmen noch keine Anhaltspunkte für eine gliäre Expression von QC. Zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt war ebenfalls keine Doppelmarkierung von QC-Expression und gliären Markern zu verzeichnen. Daher werden in den folgenden Abschnitten nur die Ergebnisse der Untersuchungen am siebten postischämischen Tag präsentiert.

QC-Expression in Astrozyten bzw. Mikroglia und Ko-Expression von QC mit HSP 27 im Striatum, sieben Tage nach Okklusion der ACM

Abbildung 14 illustriert die Aufnahmen der Fluoreszenz-Färbungen dieser Versuchsreihe im Striatum. In Abb. 14 a-c sind zwei HSP 27-exprimierende Zellen (grün) mit Sternen markiert, welche auch von dem GFAP-Antikörper erkannt wurden (rot). Es handelt sich demnach um HSP 27-synthetisierende aktivierte Astrozyten (gelb).

Abbildung 14 d-f zeigt mehrere, mit Sternen gekennzeichnete, QC-exprimierende Zellen (grün). In der Doppelmarkierung (gelb) ist deutlich zu erkennen, dass es sich hierbei um aktivierte Astrozyten (rot) handelt, welche die QC im Ischämiegebiet Striatum synthetisieren. Somit bestätigt sich, dass es sich bei den gezeigten Zellen der lichtmikroskopischen QC-Immunhistochemie (Abbildung 11 j-l) zumindest zum Teil um aktivierte, QC-exprimierende Astrozyten im Striatum handelt.

Weiterhin war eine Ko-Expression von QC (grün) und HSP 27 (rot) zu verzeichnen (Abb. 14 g-i). Die mit Stern markierten Zellen zeigen eine deutliche Überlagerung der QC und des HSP 27 (gelb). Anhand der Zellmorphologie der Zelle zentral im Bild, lässt sich vermuten, dass es sich ebenfalls um einen aktivierten Astrozyten handelt, der sowohl die QC, als auch das HSP 27 exprimiert.

In Abb. 14 j-l ist eine CD11b- und QC-Doppelmarkierung für die Untersuchung von QC-Expression in Mikrogliazellen dargestellt. Zu diesem postischämischen Zeitpunkt konnte im Striatum keine Doppelmarkierung von QC (grün) und dem Mikroglia-Marker (rot) nachgewiesen werden.

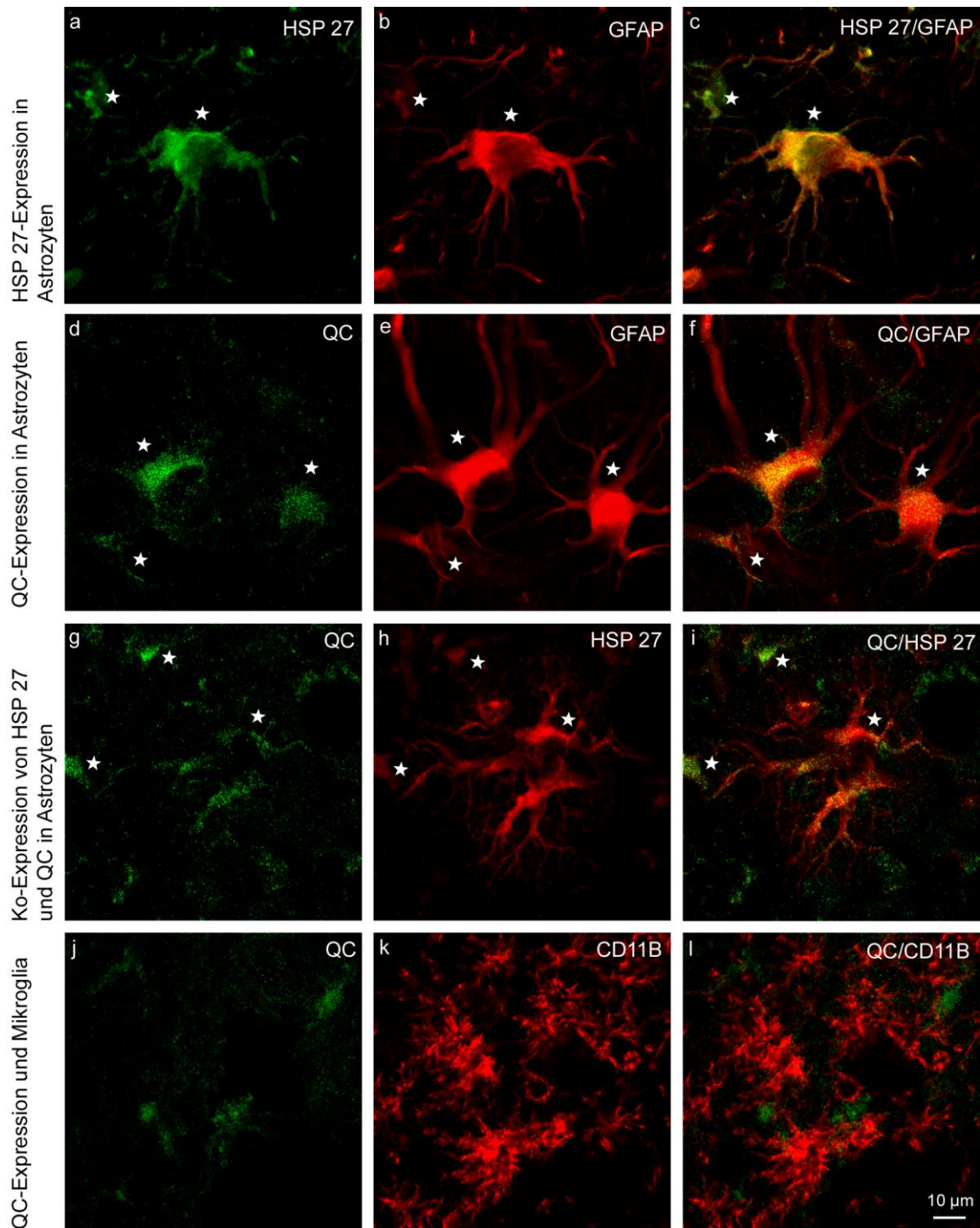


Abbildung 14: Doppelmarkierung von QC und Gliazellen: Striatum ipsilateral, 7 Tage nach Okklusion der ACM. a-c Mit Stern markiert sind zwei HSP 27-exprimierende (grün), aktivierte Astrozyten (rot) im Striatum. Man erkennt deutlich eine Doppelmarkierung (gelb) der dargestellten Zellen bis in die Zellausläufer. d-f QC-exprimierende Zellen (grün) und GFAP-positive Astrozyten (rot) im Striatum. Anhand der gelben Färbung ist zu sehen, dass die mit Stern gekennzeichneten Zellen doppelt markiert sind. Es handelt sich somit um QC-exprimierende, aktivierte Astrozyten. g-i QC-Expression (grün) und HSP 27 (rot) in Zellen des Striatums sieben Tage nach Ischämie. Die Überlagerung (gelb) der QC (grün) und des HSP 27 (rot), offenbart eine Ko-Expression der beiden Proteine in den gleichen Zellen (mit Stern markiert). Die Zellmorphologie lässt vermuten, dass es sich ebenfalls um aktivierte Astrozyten handelt. j-l Expression von QC (grün) und Aktivierung von Mikrogliazellen (rot) im Striatum nach Ischämie. Man erkennt viele aktivierte Mikroglia, eine Expression von QC lässt sich in diesen Zellen jedoch nicht nachweisen. Der Maßstabsbalken gilt für die komplette Abbildung.

QC-Expression in Astrozyten bzw. Mikroglia und Ko-Expression von QC mit HSP 27 im Hippocampus, sieben Tage nach Okklusion der ACM

Im Hippocampus, dem zweiten Untersuchungsgebiet, waren ähnliche Ergebnisse wie im Striatum zu verzeichnen. Wie bereits in den lichtmikroskopischen Aufnahmen gezeigt (Abbildung 13), ergab sich im Hippocampus auch in den Fluoreszenzfärbungen eine starke Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia. Abbildung 15 präsentiert die Ergebnisse dieser Immunhistochemie-Doppelmarkierungen.

Die Abb. 15 a-c illustriert eine fast vollständige Überlagerung der GFAP-positiven Astrozyten (rot) und der HSP 27-Expression (grün) im Hippocampus. An der gelb erscheinenden Überlagerung in Abb. 15 c, kann man die Ko-Expression beider Proteine in den mit Stern markierten Zellen bis in die Ausläufer verfolgen. Auch in diesem Gebiet bestätigt sich somit, dass die Hochregulation des HSP 27 im sekundär von der Ischämie betroffenen Hippocampus vor allem in aktivierten Astrozyten abläuft.

Eine Doppelmarkierung von QC-Expression (grün) in Astrozyten (rot) wurde im Hippocampus ebenfalls nachgewiesen (Abb. 15 d-f). Analog zu den Ergebnissen im Striatum, lassen sich auch hier QC-exprimierende Astrozyten (gelb in f, mit Stern markiert) darstellen.

Es gelang in diesem Untersuchungsgebiet ebenfalls der Nachweis einer Ko-Expression von QC (grün) und HSP 27 (rot) in den gleichen Zellen (Abb. 15 g-i). Anhand der Morphologie lässt sich nicht klar definieren, ob es sich bei der mit Stern markierten Zelle um einen Astrozyten oder ein Neuron handelt. Da aber bereits in Abb. 15 a-c gezeigt wurde, dass sich die HSP 27-Immunmarkierung fast vollständig mit dem Astrozyten-Marker GFAP deckt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch die in Abb. 15 i gezeigte Zelle einem QC- und HSP 27-exprimierenden Astrozyten entspricht.

Die Bilder in Abb. 15 j-l demonstrieren die Expression von QC (grün) und Mikrogliazellen (rot) im Hippocampus. Es findet sich in diesem Areal eine geringere Anzahl aktivierter Mikroglia als im Striatum, welches direkt von der Unterbindung der Blutversorgung betroffen war. Im Hippocampus konnte ebenfalls keine QC-Expression in Mikrogliazellen nachgewiesen werden.

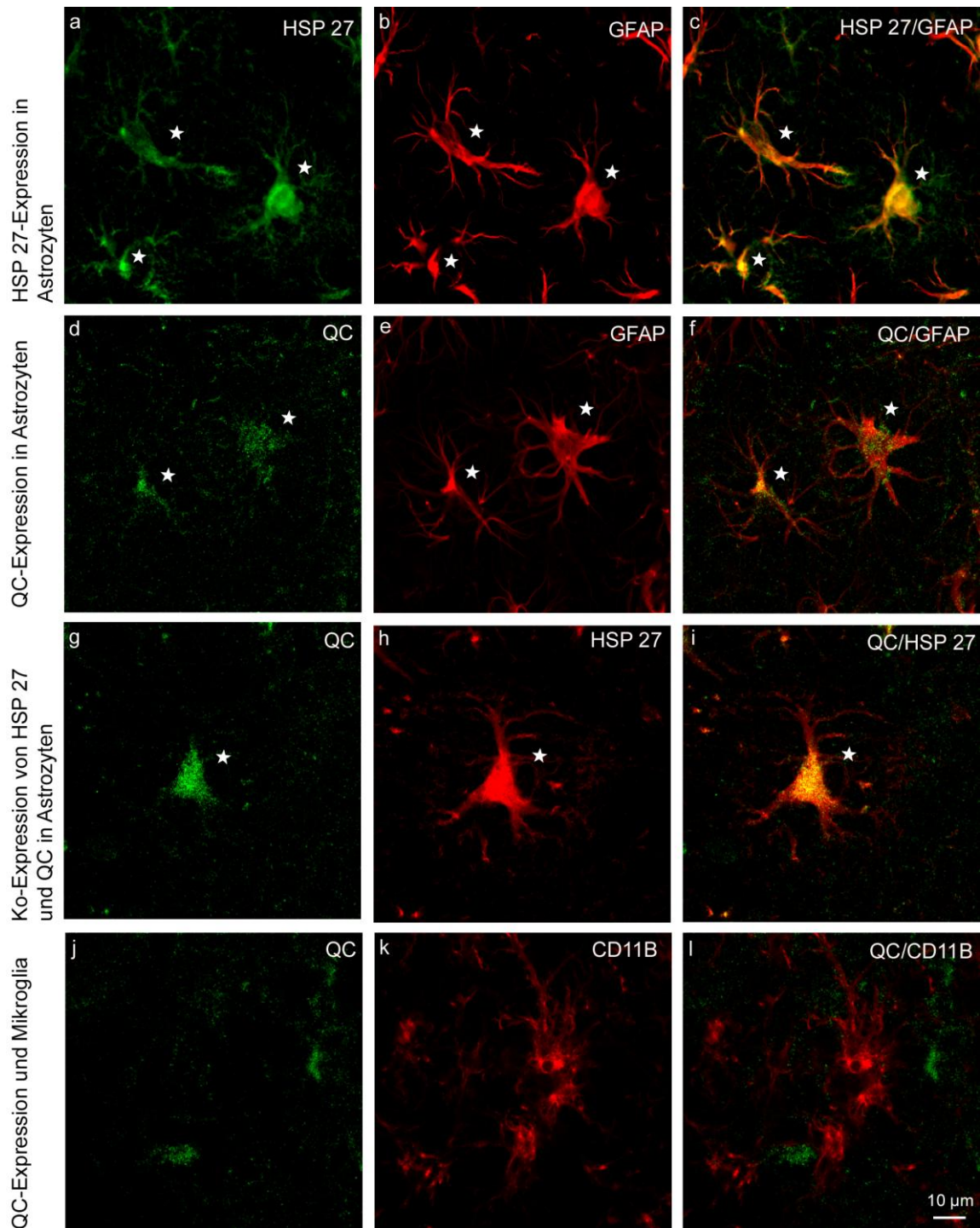


Abbildung 15: Doppelmarkierung von QC und Gliazellen: Hippocampus ipsilateral, 7 Tage nach 30-minütiger Okklusion der ACM. a-c HSP 27-Expression (grün) im Hippocampus und GFAP-Markierung von Astrozyten (rot). Es findet sich eine fast vollständige Überlagerung (gelb) von HSP 27-expressierenden Zellen und dem Astrozytenmarker. Beispielhaft sind drei Zellen mit Sternen markiert. d-f Expression von QC (grün) in Astrozyten (rot). Wie auch schon für das Striatum gezeigt, ist eine Doppelmarkierung von QC-Expression und dem Astrozytenmarker GFAP deutlich zu erkennen (gelb). Zwei QC-produzierende Astrozyten sind mit Sternen gekennzeichnet. g-i Nachweis einer Ko-Expression von QC (grün) und HSP 27 (rot) in der gleichen Zelle (mit Stern gekennzeichnet). Morphologisch lässt sich diese nicht eindeutig identifizieren, doch die große Überlagerung von HSP 27 und GFAP (siehe a-c) lässt vermuten, dass es sich bei der doppelt markierten Zelle (gelb in i) um einen Astrozyten handelt, der sowohl HSP 27, als auch QC exprimiert. j-l QC-Expression (grün) und Mikrogliaaktivierung (rot) im Hippocampus. Die Anzahl aktivierter Mikroglia fällt in diesem Gebiet wesentlich geringer aus als im Striatum. Eine Doppelmarkierung von QC und Mikroglia-Zellen ist nicht zu verzeichnen. Der Maßstabsbalken gilt für die komplette Abbildung.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der QC-Expression in Gliazellen

Tabelle 2 Ergebnisse der Doppelmarkierungen von QC mit Astrozyten- und Mikroglia markern (++) deutliche Doppelmarkierung, + schwache Doppelmarkierung, - keine Doppelmarkierung)

Nachweis von QC in	10 Tage nach Immunoläsion cholinergischer Neurone			7 Tage nach Ischämie durch transiente MCAO	
	cholinerge Kerngebiete		Projektionsgebiet	primär betroffen	sekundär betroffen
	mediales Septum	Nbm	Hippocampus	Striatum	Hippocampus
Astrozyten	++	++	++	++	+
Mikroglia	+	++	+	-	-

Sowohl nach gezielter Schädigung cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn von Ratten durch Immunoläsion mit 192-IgG-SAP, als auch nach Induktion fokaler Ischämie durch transiente MCAO bei Mäusen konnte eine Expression von QC in aktivierten Astrozyten in allen untersuchten Arealen nachgewiesen werden. Dabei bestand kein Unterschied zwischen primär von der Schädigung betroffenen Regionen im Gegensatz zu der sekundär betroffenen Hippocampus-Region.

Die Expression von QC in Mikrogliazellen hingegen konnte nur eindeutig in amöboiden, phagozytierenden Mikroglia im Nbm nachgewiesen werden. In den anderen untersuchten Gebieten zeigten sich die durch Schädigung aktivierten Mikrogliazellen in einer verzweigten Form, welche nur eine geringe oder keine Doppelmarkierung mit QC aufwies (siehe Tabelle 2). Im cholinergen Kerngebiet mediales Septum und dem cholinergen Projektionsort Hippocampus konnte bei Ratten nach cholinergischer Immunoläsion eine schwache Doppelmarkierung von QC und Mikrogliazellen dargestellt werden. In der zweiten Versuchsreihe mit fokaler Ischämie nach MCAO bei Mäusen konnte zu keinem Zeitpunkt und in keiner untersuchten Region eine Doppelmarkierung von QC-Expression und Mikroglia markern nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer mutmaßlichen Expression von QC in Gliazellen, um eine mögliche Verbindung zwischen chronischer Gliaktivierung und Alzheimer-Entstehung bzw. zwischen der Gliaktivierung nach einem schädigenden Ereignis des Gehirns und der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz darzustellen.

Die QC katalysiert die Zyklisierung der in der A β -Sequenz an dritter Stelle stehenden Aminosäure Glutamat zu pyro-Glutamat und somit die Bildung des hoch toxischen und als Aggregationskern wirkenden pE-A β (Schilling et al. 2008a; Nussbaum et al. 2012; Hartlage-Rübsamen et al. 2011). Das Enzym wurde bei Mäusen und in post mortem gewonnenem Hirngewebe von Alzheimer-Patienten in Arealen nachgewiesen, die wichtig für Motivation und Kognition sind, Bereiche die auch beim Morbus Alzheimer schwer betroffen sind wie z.B. der Hippocampus, der Edinger-Westphal-Kern oder der Nucleus basalis Meynert (Morawski et al. 2010; Hartlage-Rübsamen et al. 2009). Die bisherigen Studien zur QC-Expression und ihrer Rolle in der Alzheimer-Pathologie beziehen sich jedoch ausschließlich auf Neurone (Hartlage-Rübsamen et al. 2009). Eine gliäre Synthese der QC wurde bislang nicht untersucht. Da aber die Alzheimer Pathologie u.a. von einer starken Gliaktivierung in und um die Amyloid-Plaques gekennzeichnet ist (Heneka, Rodríguez & Verkhratsky 2010), wurde diese Versuchsreihe an zwei verschiedenen Schädigungsmodellen durchgeführt, um eine mögliche QC-Induktion im Kontext einer Gliaktivierung nach Schädigung des Gehirns zu untersuchen.

In der Fachliteratur werden verschiedene Ansätze zur Klärung der Frage, ob die Gliaktivierung eine Folge oder Ursache der Amyloid-Ablagerung darstellt, diskutiert. Ziel der Versuchsreihen dieser Arbeit war es, eine mögliche weitere Komponente der gliären Pathologie in der Alzheimer-Entstehung, eine gliäre Expression der QC, zu untersuchen.

Verschiedene Grundvoraussetzungen für die A β -Bildung in Astrozyten wurden bereits durch andere Studien nachgewiesen. So zeigten mehrere Arbeitsgruppen, dass nach einer Schädigung des Hirnparenchyms, z.B. durch Ischämie, die APP-Expression in aktivierten Astrozyten und Mikrogliazellen ab dem dritten Tag nach dem Schädigungsereignis ansteigt (Banati et al. 1995; Hall et al. 1995; Nihashi et al.

2001). Weiterhin konnte ein Anstieg von A β in Astrozyten in einer Versuchsreihe mit MCAO bei Wildtyp-Ratten ab dem siebten Tag nach Ischämie beobachtet werden, ohne Nachweis von A β in degenerierten Neuronen oder im Extrazellulärraum, sodass der Autor von einer astrozytären A β -Bildung ausgeht (Nihashi et al. 2001). Zu diesem Befund passt das Ergebnis einer Studie an Ratten-Gehirnen, welche die Expression von BACE-1 in aktivierten Astrozyten nach Läsion cholinergischer Neurone durch Injektion von 192-IgG-Saporin und nach permanenter MCAO nachwies (Hartlage-Rübsamen et al. 2003). Durch die katalytische Aktivität der Protease BACE-1 wird der N-Terminus des A β -Peptids generiert (Banati et al. 1995), was einen unabdingbaren Schritt in der A β -Entstehung darstellt. Durch den Nachweis einer QC-Expression in aktivierten Astrozyten wäre demnach eine Bildung von toxischen pE-A β -Peptiden aus dem in Astrozyten gebildeten A β denkbar, wenn eine N-terminale Verkürzung der A β -Peptide erfolgte. Da Astrozyten in der Alzheimer-Pathologie eng mit A β -Plaques verknüpft sind (Itagaki et al. 1989), wäre als Schlussfolgerung aus den oben genannten Entdeckungen ein Beitrag von aktivierten Astrozyten zur A β -Pathologie bzw. zur Bildung eines Aggregationskernes durch Synthese von pE-A β -Peptiden denkbar.

5.1 Methodische Betrachtungen

Zur Untersuchung der oben genannten Fragestellung wurde die Methode der Immunhistochemie ausgewählt, da sie durch Doppelmarkierungen Schlussfolgerungen darüber zulässt, in welchem Zelltyp die QC exprimiert wird. Eine quantitative Aussage über die Änderung der QC-Expression nach einer Schädigung kann in diesem Verfahren jedoch nicht getroffen werden. Bei PCR- oder Western-Blot-Untersuchungen wäre hingegen nur eine mögliche quantitative Änderung der QC-Expression nach Schädigung messbar, jedoch ohne Information darüber, in welchen Zellen diese abläuft. Da die Fragestellung spezifisch auf eine astrozytäre und mikrogläre Expression der QC abzielte, war in diesem Fall die Immunhistochemie das beste Verfahren.

Zur Darstellung von Mikrogliazellen wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Methoden benutzt. In Vorversuchen zeigte sich, dass durch das Lektin GSA im Rattengewebe im Gegensatz zum CD11b-Antikörper die beste spezifische

Markierung von Mikroglia erreicht wurde. Der in der Maus-Versuchsreihe verwendete Iba-1-Antikörper lieferte im Hirngewebe von Ratten keine zufriedenstellende Darstellung von Mikroglia. Im Mäusegehirn hingegen ergab sich durch den Iba-1-Antikörper eine sehr gute lichtmikroskopische Darstellung von Mikrogliazellen in der DAB-Visualisierung. Dieser Antikörper konnte allerdings nicht zusammen mit dem QC-Antikörper eingesetzt werden, da beide aus dem Kaninchen stammen. Daher wurde für die Darstellung der Doppelmarkierung von Mikroglia und QC im Mäusegehirngewebe auf den Antikörper gegen CD11b aus der Ratte zurückgegriffen.

Das saure Gliafaserprotein (GFAP = glial fibrillary acidic protein) ist Teil des Zytoskeletts reifer Astrozyten, und wird als standardisierter Marker zum immunhistochemischen Nachweis von Astrozyten eingesetzt (Eng, Ghirnikar & Lee 2000). Da es nicht in jedem Fall die feinen Verästelungen der Zellen darstellt und nicht in allen Astrozyten des gesunden Parenchyms exprimiert wird, also kein panastrozytärer Marker ist, kann eine entsprechende Immunhistochemie die Zellgröße und Astrozytenanzahl unterschätzen (Nedergaard, Ransom & Goldman 2003; Sofroniew & Vinters 2010). Durch die Hochregulation des GFAP bei der Aktivierungsreaktion von Astrozyten, die das Protein zuvor nicht, oder nur in geringem Maße exprimiert haben, könnte es in der Immunhistochemie fälschlich so erscheinen, als sei die Anzahl der Astrozyten im Gewebe angestiegen (Sofroniew & Vinters 2010). Die Färbung einer Zelle nach GFAP-Immunhistochemie identifiziert diese jedoch eindeutig als Astrozyt, da die GFAP-Expression auf diesen Zelltyp beschränkt ist (Eng, Ghirnikar & Lee 2000).

5.2 Auswirkungen der cholinergen Immunoläsion

Das Ausmaß, der durch cholinerge Immunoläsion mit 192-IgG-SAP erzeugten Zellschädigung im basalen Vorderhirn, war mit publizierten Ergebnissen vergleichbar (Book, Wiley & Schweitzer 1992; Rossner et al. 1995), so dass von einer Wirksamkeit der Neurotoxininjektion ausgegangen werden kann.

Diese Versuchsreihe erbrachte eine spezifische Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia in den cholinergen Gebieten des basalen Vorderhirns, dem medialen Septum, dem horizontalen und vertikalen Diagonalband von Broca und dem Nucleus basalis magnocellularis. Eine moderate Gliaaktivierung wurde in einem cholinergen Projektionsgebiet, dem hier untersuchten Hippocampus, v.a. im Gyrus dentatus, beobachtet. Die Neurone der cholinergen Kerngebiete sind direkt von der Immunoläsion betroffen und es kommt zu einem Zelluntergang in den entsprechenden Bereichen mit morphologisch sichtbarer, ausgeprägter Gliaaktivierung. Im Vergleich ist der Hippocampus als Projektionsgebiet nur indirekt durch die Degeneration cholinergischer Synapsen betroffen, welches die in dieser Arbeit beschriebene schwächere hippocampale Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen erklärt. Dieser Befund wurde für Mikroglia bereits beschrieben (Rossner et al. 1995).

Die lichtmikroskopische Darstellung von QC-exprimierenden Zellen zeigte hauptsächlich physiologisch vorkommende QC-synthetisierende Neurone im Nbm und im Hippocampus, wie bereits für Mausgewebe publiziert wurde (Hartlage-Rübsamen et al. 2009; Morawski et al. 2010). Im Gegensatz des in der Maus beschriebenen hippocampalen Vorkommens von QC in der Molekularschicht und im Hilus des Gyrus dentatus (Hartlage-Rübsamen et al. 2009), wurde in dieser Arbeit bei Ratten eine stärkere neuronale QC-Expression im Stratum granulare und im Hilus des Gyrus dentatus nachgewiesen. Diese andersartige QC-Expression bei Ratten im Vergleich zu Mäusen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Prof. Stephan von Hörsten, Erlangen, persönliche Mitteilung).

Neben der neuronalen QC-Darstellung erfolgte jedoch auch eine leichte Markierung von gliär erscheinenden Zellen. Die Schwierigkeit einer solchen Einfachmarkierung mit DAB-Visualisierung stellt die fehlende Möglichkeit zur eindeutigen Identifizierung der QC-exprimierenden Zellart dar. Man kann lediglich Vermutungen anstellen, ob es

sich um kleine Neuronen, Astrozyten oder Mikrogliazellen handelt. Weiterhin war die Markierung dieser Zellen in der DAB-Darstellung eher schwach, was die Identifizierung weiter erschwerte. Zur Verifizierung einer gliären QC-Expression wurden daher Doppelmarkierungen mit Mikroglia- und Astrozytenmarkern durchgeführt.

Wie im Abschnitt 4.3 zusammengefasst (siehe Tabelle 2), konnte bei den mit Immunotoxin behandelten Tieren in allen untersuchten Hirngebieten eine QC-Expression in durch cholinerge Zellschädigung aktivierten Astrozyten nachgewiesen werden. Die Doppelmarkierung des Astrozytenmarkers GFAP mit QC war sowohl im Soma als auch in den dickeren Zellausläufern der Astrozyten präsent. Der Nachweis dieser astrozytären QC-Expression könnte ein Schritt sein, die Alzheimer-Pathologie besser zu verstehen. Wie bereits beschrieben, liegt in Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine deutliche Astrozyten-Aktivierung in der Umgebung von A β -Plaques vor. Da Astrozyten durch viele verschiedene Arten der Gewebeschädigung aktiviert werden können, und daraufhin sowohl die APP-Expression (Banati et al. 1995; Nihashi et al. 2001), als auch die BACE-1-Synthese (Hartlage-Rübsamen et al. 2003) und die QC-Expression, wie in dieser Arbeit beschrieben, hochreguliert werden, ist Anlass zu der Annahme gegeben, dass Astrozyten einen Anteil an der Entstehung von toxischen pE-A β -Peptiden haben. Besonders das erhöhte Risiko nach einem schädigenden Ereignis, wie beispielsweise einem Schlaganfall, an der Alzheimer-Demenz zu erkranken (Pasquier & Leys 1997), könnte durch eine Aktivierung von Astrozyten mit Hochregulierung der APP-Synthese, BACE-1- und QC-Expression erklärt werden.

Eine QC-Expression in aktivierter Mikroglia war nicht eindeutig nachzuweisen. Zwar wurde durch die Läsion cholinergischer Neurone sowohl in den cholinergen Gebieten des basalen Vorderhirns als auch im Projektionsgebiet Hippocampus eine Aktivierung von Mikrogliazellen hervorgerufen, der Nachweis einer mikroglialen QC-Expression war jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt. Im medialen Septum und im Hippocampus stellten sich die aktivierten Mikroglia als stark verzweigte Zellen dar. Die Doppelmarkierung mit QC ergab nur eine schwache Übereinstimmung von Mikrogliamarkern und QC-Expression. Im Nbm hingegen zeigte sich eine massive Aktivierung von Mikrogliazellen, welche sich durch eine amöboide Morphologie

auszeichneten, sich somit wahrscheinlich im phagozytierenden Stadium befanden. In diesem Kerngebiet war eine fast vollständige Überlagerung von QC-Expression und den amöboiden Mikrogliazellen zu erkennen. Die Markierung von QC fiel ebenfalls viel stärker aus als in den anderen Untersuchungsgebieten. Nach diesen Ergebnissen ist es jedoch schwer eine Aussage darüber zu treffen, ob die QC-Expression tatsächlich in aktivierten Mikroglia stattfindet oder ob die Markierung durch Phagozytose von QC-exprimierenden, degenerierten Neuronen erfolgt.

In vitro und in Tierversuchen wurde gezeigt, dass Mikrogliazellen in der Lage sind lösliches und fibrilläres A β zu phagozytieren (Rogers et al. 2002). Es wird jedoch vermutet, dass die phagozytotische Kapazität der Mikroglia in von der Alzheimer-Pathologie betroffenem menschlichen Hirngewebe bei chronisch hoher A β -Produktion nicht ausreichen könnte (Streit, Mrak & Griffin 2004; Lue et al. 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Mikroglia in Plaqueumgebung fragmentiert anstatt aktiviert sind, was ihre fehlende Fähigkeit zur Phagozytose von A β und Neuroprotektion erklären könnte (Streit 2004; Streit et al. 2009). Eine andere Theorie besagt, dass besonders die Bildung schwer löslicher A β -Ablagerungen beim Menschen die Phagozytose erschwert und dass im Rahmen einer chronischen Inflammation durch dauerhafte Stimulation der Mikrogliaaktivierung potentiell neurotoxische Moleküle freigesetzt werden, die zur Neurodegeneration beitragen (Rogers et al. 2002; Skaper 2007).

Eine Aussage über die Rolle der Mikroglia in der Alzheimer-Pathologie ist anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich. Da jedoch der QC-Nachweis in amöboider Mikroglia erfolgte, sollten weitere Untersuchungen zur Differenzierung zwischen einer rein phagozytierenden und einer inflammatorischen Rolle der Mikroglia in der AD unter der Berücksichtigung einer möglichen mikroglären QC-Induktion und somit eines weiteren gliären Beitrags zur Bildung von pE-A β erfolgen.

5.3 Auswirkungen der transienten Ischämie

Die zweite Versuchsreihe mit Induktion eines fokalen ischämischen Infarktes durch transiente MCAO bei Mäusen wurde als weiteres in vivo-Modell der Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten herangezogen. Als Schädigungsmodell wurde die 30-minütige MCAO (intraluminale Okklusion) gewählt, da durch diese Methode ein einseitiger ischämischer Infarkt entsteht, die Versuchstiere aber im Vergleich zu einem permanenten Verschluss der MCAO oder längeren Okklusionszeiten eine geringere Sterblichkeit und weniger neurologische Defizite zeigen (Longa et al. 1989). Im Vergleich zur direkten Elektrokoagulation der MCA nach Tamura (Tamura et al. 1981), bei der ausschließlich striatale und neokortikale Versorgungsgebiete der ACM einen Anstieg von Ischämiemarkern z.B. HSP 70 aufweisen, kann bei der intraluminalen MCAO durch den Zugang über die Arteria carotis interna (ACI) eine Mitbeteiligung der Äste der ACI und somit eine eingeschränkte Blutversorgung von Hippocampus und Thalamus auftreten (Kanemitsu et al. 2002). Diese Gebiete können über die Arteria communicans posterior (ACoM), welche die ACI mit der Arteria cerebri posterior verbindet, betroffen sein (Kanemitsu et al. 2002). Die Ausbreitung des Infarkts auf Areale außerhalb des Versorgungsgebietes der ACM ist von der Anatomie des Circulus Arteriosus Willisii und der ACoM abhängig, welche vor allem bei Mäusen sehr variabel sein kann (Kitagawa et al. 1998; Kanemitsu et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit war eine Mitbeteiligung des Hippocampus erwünscht, da dieser in der Alzheimer-Pathologie stark betroffen ist und so ein interessantes Untersuchungsgebiet darstellte.

Immunhistochemisch untersucht wurden das Striatum und der Hippocampus, jeweils am zweiten und am siebten Tag nach MCAO. Durch dieses Vorgehen sollte ein zeitlicher Verlauf der Expression von HSP 27, Astrozyten, Mikroglia und QC dargestellt werden.

Durch die Anfärbung von HSP 27 wurde das Auftreten und das jeweilige Ausmaß des ischämischen Infarktes bei den operierten Mäusen dargestellt. HSP 27 wird unter physiologischen Bedingungen nur in geringem Maße von Astrozyten und Endothelzellen der Blutgefäße gebildet (Popp et al. 2009), aber durch schädigende Ereignisse wie Neurodegeneration, Infektion oder Ischämie hochreguliert (Kato et al. 1994; Kato et al. 1995). In einer Studie mit transienter MCAO bei Ratten wurde ab

dem ersten postischämischen Tag eine Expression von HSP 27 v.a. in Mikroglia und vereinzelt Neuronen in der Peripherie des ischämischen Bereichs nachgewiesen, die HSP 27-Expression in Astrozyten zeigte sich hingegen in weiten Bereichen der ipsilateralen Hemisphäre, u.a. dem ventromedialen Striatum, dem Hippocampus und Teilen des Thalamus, zum Teil sogar in der kontralateralen Hemisphäre (Kato et al. 1995). Sieben bzw. 14 Tage nach MCAO erfolgte der Nachweis von HSP 27 v.a. in Astrozyten, während corticale Neurone kaum noch markiert wurden (Kato et al. 1995). Im Vergleich zu anderen Ischämie-Markern wie z.B. HSP 70 stellte sich in der HSP 27-Immunhistochemie ein größeres Areal dar, da auch in der Penumbra die Expression von HSP 27 v.a. in Gliazellen hochreguliert wird (Popp et al. 2009). In einer anderen Studie wurde eine HSP 27-Hochregulation nach transientser MCAO im Infarktkern nur in Endothelzellen und einigen Mikroglia beobachtet, es zeigte sich jedoch eine starke HSP 27-Expression in den Astrozyten der Glianarbe und in umgebenden Strukturen wie dem Hippocampus, thalamischen und hypothalamischen Gebieten, z. T. sogar in kontralateralen Arealen (Popp et al. 2009).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der beiden genannten Studien, wurde in dieser Arbeit eine Hochregulation von HSP 27 im direkt von der Ischämie betroffenen Bereich Striatum, aber auch im Hippocampus beobachtet, welcher nicht im Versorgungsgebiet der ACM liegt, jedoch durch eine Mitbeteiligung der AComP über die ACI auch einer Minderperfusion unterliegen kann. Es zeigte sich ebenfalls ein progredienter Verlauf der HSP 27-Expression vom zweiten bis zum siebten postischämischen Tag, parallel zum Anstieg der Zahl aktivierter Astrozyten, welche den Hauptanteil der HSP 27-exprimierenden Zellen darstellten. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die Induktion eines fokalen ischämischen Infarktes bei den Mäusen mit MCAO eingetreten ist.

Die Aktivierung von Astrozyten fiel am zweiten postischämischen Tag nur moderat aus. Am siebten Tag hingegen war im Striatum und auch im Hippocampus eine starke Aktivierungsreaktion zu verzeichnen. Dieser Zeitverlauf entspricht der typischen Dynamik astrozytärer Aktivierung, welche nach Schädigung erst verzögert einsetzt (Palacios et al. 1995; Nihashi et al. 2001).

Die Mikrogliaaktivierung verlief akut mit einer nur leichten Steigerung vom zweiten zum siebten postischämischen Tag. Auch dieser Verlauf ist typisch, da die

Aktivierung von Mikrogliazellen schon einige Stunden nach einem schädigenden Ereignis vollständig manifest wird (Verkhatsky & Butt 2013).

In den Einfachmarkierungen dieser Versuchsreihe konnte bei der Expression von QC in nicht-neuronalen Zellen ebenfalls ein zeitlicher Verlauf dargestellt werden. Am zweiten postischämischen Tag waren im Striatum nur sehr wenige QC-exprimierende Zellen zu verzeichnen, bei denen es sich um erste aktivierte Astrozyten handeln könnte. Im Hippocampus zeigten sich nur die physiologisch vorkommenden QC-exprimierenden Neurone, wie bei Hartlage-Rübsamen et al. beschrieben (Hartlage-Rübsamen et al. 2009). Nach sieben Tagen wurden viele Zellen durch den QC-Antikörper markiert, die morphologisch Astrozyten ähnelten. In den nachfolgenden Doppelmarkierungen wurden diese Zellen, entsprechend der Dynamik der Astrozytenaktivierung, als Astrozyten identifiziert. Zum Zeitpunkt zwei Tage nach Ischämie gab es keine Überlagerung von Gliazellen und QC-Markierung, nach sieben Tagen war jedoch eine deutliche Doppelmarkierung mit Astrozyten sowohl im Striatum, als auch im Hippocampus nachzuweisen. Ebenfalls war eine Doppelmarkierung von QC und HSP 27 in Astrozyten zu verzeichnen, was die These stützt, dass QC von den durch Ischämie aktivierten Astrozyten exprimiert bzw. hochreguliert wird.

Eine Ko-Expression von QC- und Mikroglia markern konnte hingegen in dem Ischämiemodell nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis passt zu den Resultaten der ersten Versuchsreihe, da nach Ischämie nur stark verzweigte, aktivierte Mikroglia, nicht aber eindeutig amöboide Mikroglia beobachtet wurden. Es konnte in dieser Versuchsreihe keine QC-Expression in nicht-phagozytierenden Mikroglia nachgewiesen werden.

5.3.1 Demenzielle Entwicklung nach Schlaganfall

Diese Untersuchung von QC-Expression in aktivierten Gliazellen in Folge einer ischämischen Schädigung ist auch hinsichtlich der Frage nach der Entstehung einer Demenz nach ischämischem Schlaganfall beim Menschen interessant. Laut einer 2010 veröffentlichten Meta-Analyse von Savva et. Al. verdoppelt sich das Risiko an einer Form von Demenz zu erkranken nach Auftreten eines Schlaganfalls (Savva & Stephan 2010). Es wird beschrieben, dass bis zu 30% der Patienten innerhalb von 5 Jahre nach Schlaganfall mit einer Demenz diagnostiziert werden, die meisten davon im ersten Jahr (Leys et al. 2005; Henon et al. 2001). Dabei ist nicht nur die Wahrscheinlichkeit einer vaskulären Demenz erhöht, sondern auch das Risiko an Alzheimer-Demenz zu erkranken, welche sich durch ihren progredienten Verlauf nach einem Schlaganfall auszeichnet (Pasquier & Leys 1997) und etwa ein Drittel der Fälle von Demenz nach einem Schlaganfall ausmacht (Henon et al. 2001).

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer ischämischen Schädigung und der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz besteht in einer erhöhten APP-Expression im Gehirn nach verschiedenen schädigenden Ereignissen z.B. globaler oder fokaler Ischämie, mechanischem Trauma oder im Tierversuch nach Injektion von Neurotoxinen (Hall et al. 1995). In ruhenden Astrozyten des ungeschädigten Gewebes und bei Kontrolltieren ist APP nur in sehr geringem Maße nachweisbar, wohingegen es in Neuronen unter physiologischen Bedingungen ubiquitär exprimiert wird (Banati et al. 1995; Palacios et al. 1995). Verschiedene Studien mit Ratten und Hamstern haben gezeigt, dass nach transienter oder globaler Ischämie des Vorderhirns die Expression von APP zunächst stark abfällt, parallel zu einem fast vollständigen Untergang der Neurone im Infarktgebiet bis zu 72h nach Ischämie (Palacios et al. 1995; Nihashi et al. 2001; Hall et al. 1995). Ab dem dritten post-ischämischen Tag wurde eine starke Aktivierungsreaktion von Astrozyten beobachtet, einhergehend mit einer parallel ansteigenden Expression von APP in den aktivierten Astrozyten, was für eine Synthese von APP in Astrozyten spricht und gegen die Aufnahme aus nekrotischen Neuronen (Hall et al. 1995; Nihashi et al. 2001). Die verstärkte Expression von APP wurde bis zu 30 Tage nach Ischämie beobachtet, mit einem Maximum am 4.-7. postoperativen Tag (Nihashi et al. 2001; Banati et al. 1995).

Desweiteren konnte in aktivierten Astrozyten nach Ischämie A β nachgewiesen werden, dessen Vorkommen parallel zur GFAP- und APP-Expression bis zum 30. post-ischämischen Tag anstieg, während ab dem 7. postoperativen Tag kein Nachweis von A β in Neuronen erfolgte (Nihashi et al. 2001). Dieser Befund spricht für eine A β -Produktion in Astrozyten anstatt einer Phagozytose aus degenerierten Neuronen (Nihashi et al. 2001).

Während aktivierte Astrozyten eher in der Peripherie des Infarktgebietes nachzuweisen waren, zeigten sich aktivierte Mikrogliazellen im Infarktkern lokalisiert (Nihashi et al. 2001). Auch in diesen war APP nachweisbar, welches durch eigene Synthese oder durch Phagozytose degenerierter Neurone in die Zelle gelangt sein könnte (Banati et al. 1995; Nihashi et al. 2001).

Ein weiterer Verbindungspunkt zwischen einem Schlaganfall und der Erkrankung an Alzheimer-Demenz könnte, aufgrund der hier gezeigten Befunde in der postischämischen Expression von QC in aktivierten Gliazellen liegen. Wie im letzten Abschnitt für die APP-Expression und A β -Synthese beschrieben, wurde auch in dieser Arbeit ein Anstieg von QC-positiven Astrozyten im Ischämiegebiet nicht bereits am zweiten postischämischen Tag sondern erst im weiteren Verlauf, parallel zur Astrozytenaktivierung, beobachtet.

5.4 Ausblick dieser Arbeit

In dieser Arbeit ist ein eindeutiger Nachweis der QC-Expression in Astrozyten in beiden untersuchten Läsionsmodellen, cholinerge Immunläsion in der Ratte und Ischämie in der Maus, mit unterschiedlicher Dynamik erfolgt.

Eine Darstellung von QC in aktivierten Mikrogliazellen gelang nur eindeutig in deren phagozytierender Form, sodass auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass diesem Befund eine Aufnahme der QC aus phagozytierten, degenerierten Neuronen zu Grunde liegen könnte. Zur Klärung der Frage, ob der Lokalisation von QC in Mikrogliazellen eine QC-Synthese oder eine Phagozytose des Enzyms durch die amöboide Form zugrunde liegt, könnte eine Darstellung von QC in intrazellulären Kompartimenten angefertigt werden. Eine andere experimentelle Option bestünde darin, die Expression von QC in einer rein mikroglialen Zellkultur unter inflammatorischen Bedingungen zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit brachte erste, qualitative Befunde zu einer gliären Expression von QC, die in weiterführenden Untersuchungen mit einer erhöhten Anzahl von Versuchstieren validiert und statistisch ausgewertet werden sollten. In einem nächsten Schritt wäre es interessant zu untersuchen, ob die hier erzielten Ergebnisse in einem Tiermodell, das speziell einen pathologischen Aspekt der Alzheimerschen Erkrankung untersucht, reproduziert werden können. Da in der hier durchgeführten Versuchsreihe keine transgenen Tiere und demnach keine Entstehung von A β -Plaques vorlag, sollte die Expression von QC in Astrozyten und Mikroglia in der Plaque-Umgebung untersucht werden, um zu verifizieren, ob die gliäre QC-Expression eine Rolle in der Entstehung von pE-A β spielen könnte. Diese Fragestellung könnte anhand von transgenen Mausmodellen mit A β -Pathologie und Hirngewebe verstorbener Alzheimer-Patienten untersucht werden. Außerdem sollte die hier zum ersten Mal dargestellte QC-Expression in aktivierten Astrozyten und in phagozytierender Mikroglia durch eine Analyse von pE-A β -Bildung bzw. der A $\beta_{3(pE)-40/42}$ -Konzentration in Gliazellen erweitert werden. So könnte die These der gliären QC-Beteiligung an der pE-A β -Bildung verifiziert werden.

Falls sich die hier gewonnenen Erkenntnisse in weiteren Versuchen bestätigen, könnte die Beeinflussung der Aktivierungsreaktion von Gliazellen im Gehirn von Alzheimer-Patienten in der Zukunft eine therapeutische Option darstellen, um nicht nur die mit der AD verbundene Inflammation sondern auch die pE-A β -Produktion zu reduzieren.

6 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Expression der Glutaminylzyklase in Gliazellen nach Schädigung von Hirngewebe

eingereicht von:

Julia Brune

angefertigt an der Universität Leipzig im Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung

betreut von Prof. Dr. rer. nat. Steffen Roßner

eingereicht: November 2013

Thesen:

1. Der Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die sich durch progredienten Verlust kognitiver Fähigkeiten äußert. Sie ist histopathologisch durch A β -Plaques, Neurofibrillenbündel, eine starke Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen und den Untergang cholinerg Neurone des basalen Vorderhirns gekennzeichnet.
2. A β wird durch die β -Sekretase (BACE-1) und die γ -Sekretase aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) generiert und weist eine Länge von 40 bzw. 42 Aminosäuren auf. Durch Trunkierung der A β -Proteine um 2 oder 10 Aminosäuren am N-Terminus und anschließende Zyklisierung des endständigen Glutamats durch die Glutaminylzyklase (QC) entstehen Pyroglutamat- β -Amyloid-Proteine (pE3-A β und pE11-A β). Besonders das A $\beta_{3(pE)-40/42}$ findet sich früh in senilen Plaques und neigt stärker als andere A β -Formen zur Aggregation. Es besteht die Theorie, dass pE-A β einen Aggregationskern für andere A β -Proteine darstellt, diese dem proteolytischen Abbau entzieht und so als Nidus für die Bildung von A β -Plaques wirkt.

3. Die QC wurde im Tiermodell und in menschlichem Hirngewebe in Neuronen des Hippocampus, des Edinger-Westphal Kerns, des Locus coeruleus und des Nucleus basalis Meynert nachgewiesen. Es zeigte sich ein rein neuronales Vorkommen, eine QC-Expression in Gliazellen unter physiologischen Bedingungen wurde nicht beobachtet. Die Expression von QC in aktivierten Gliazellen unter pathologischen Bedingungen sollte in dieser Arbeit untersucht werden.
4. In Schädigungsmodellen kann durch Injektion von 192-IgG-Saporin und einem damit einhergehenden cholinergen Neuronenuntergang oder durch Ischämie eine Aktivierung von Astrozyten und Mikrogliazellen erreicht werden. Vor allem die Schädigung cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn stellt eine wichtige Untersuchungsbedingung dar, da die Alzheimer-Pathologie ebenfalls von einem cholinergen Neuronenverlust begleitet wird. Nach Aktivierung durch A β setzen Astrozyten ebenso wie Mikrogliazellen eine Reihe proinflammatorischer Moleküle frei und schaffen so eine chronisch entzündliche Umgebung im Bereich von A β -Plaques.
5. Nach Aktivierung von Astrozyten konnte in Schädigungsmodellen eine gesteigerte APP-Expression sowie BACE1-Synthese, ebenso wie eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von A β nachgewiesen werden. Auch bei Alzheimer-Patienten konnte in unmittelbarer Nähe von A β -Plaques BACE-1 und eine hohe intrazelluläre Konzentration von A β ₁₋₄₂ in Astrozyten dargestellt werden. Eine astrozytäre Beteiligung an der (pE-)A β -Akkumulation ist demnach denkbar.
6. In dieser Arbeit wurde die Expression von QC in aktivierten Astrozyten nach Induktion eines cholinergen Neuronenverlustes bzw. nach ischämischer Beeinträchtigung in primär geschädigten Gebieten und in sekundär betroffenen Arealen nachgewiesen. Ebenfalls gelang die Darstellung einer QC-Expression in phagozytierenden Mikroglia bei cholinergem Neuronenuntergang, jedoch nicht in nicht-phagozytierenden, aktivierten Mikrogliazellen.
7. Nach Trunkierung der in aktivierten Astrozyten gebildeten A β -Proteine könnte die in diesen Astrozyten exprimierte QC die Bildung von pE-A β katalysieren und so die Entstehung eines Aggregationskerns für A β -Plaques verursachen. Auch eine Verbindung zwischen einem Schlaganfall-Ereignis und der

Entwicklung einer Alzheimer-Demenz wäre über den Pathomechanismus der pE-A β -Bildung in aktivierten Astrozyten des ischämischen Gewebes denkbar.

8. Eine Inhibition der Astrozytenaktivierung könnte demnach nicht nur durch Unterdrückung der Inflammationsreaktion in der Plaque-Umgebung, sondern auch durch Hemmung der astrozytären pE-A β -Synthese eine therapeutische Option für die Alzheimersche Erkrankung darstellen.

Literaturverzeichnis

- Alzheimer, A 1910, 'Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe' in *Histologische und histopathologische Arbeiten über die Großhirnrinde mit besonderer Berücksichtigung der pathologischen Anatomie der Geisteskrankheiten*, eds F Nissl & Alzheimer A., Gustav Fischer, Jena, pp. 401–562.
- Arendt, T, Bigl, V, Tennstedt, A & Arendt, A 1985, 'Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease', *Neuroscience*, vol. 14, no. 1, pp. 1–14.
- Ballatore, C, Lee, VM & Trojanowski, JQ 2007, 'Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders', *Nat Rev Neurosci*, vol. 8, no. 9, pp. 663–672.
- Banati, RB, Gehrman, J, Wiessner, C, Hossmann, KA & Kreutzberg, GW 1995, 'Glial expression of the beta-amyloid precursor protein (APP) in global ischemia', *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 15, no. 4, pp. 647–654.
- Bartus, RT, Dean, RL3, Beer, B & Lippa, AS 1982, 'The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction', *Science*, vol. 217, no. 4558, pp. 408–414.
- Bazan, N 2012, 'Neuroinflammation' in *Basic neurochemistry. principles of molecular, cellular and medical neurobiology*, ed Brady, ST & Siegel, GJ, Elsevier, Academic Press, Amsterdam ; Heidelberg [u.a.], pp. 610–620.
- Bertram, L, Lill, CM & Tanzi, RE 2010, 'The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future', *Neuron*, vol. 68, no. 2, pp. 270–281.
- Block, ML, Zecca, L & Hong, J 2007, 'Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms', *Nat Rev Neurosci*, vol. 8, no. 1, pp. 57–69.
- Book, AA, Wiley, RG & Schweitzer, JB 1992, 'Specificity of 192 IgG-saporin for NGF receptor-positive cholinergic basal forebrain neurons in the rat', *Brain Res*, vol. 590, no. 1-2, pp. 350–355.
- Braak, H & Braak, E 1991, 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathol*, vol. 82, no. 4, pp. 239–259.
- Busby, WH Jr., Quackenbush, GE, Humm, J, Youngblood, WW & Kizer, JS 1987, 'An enzyme(s) that converts glutamyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes', *J Biol Chem*, vol. 262, no. 18, pp. 8532–8536.
- Bush, TG, Puvanachandra, N, Horner, CH, Polito, A, Ostefeld, T, Svendsen, CN, Mucke, L, Johnson, MH & Sofroniew, MV 1999, 'Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice', *Neuron*, vol. 23, no. 2, pp. 297–308.
- Cagnin, A, Kassiou, M, Meikle, SR & Banati, RB 2006, 'In vivo evidence for microglial activation in neurodegenerative dementia', *Acta Neurol Scand Suppl*, vol. 114, suppl. s185, pp. 107–114.
- Chen, Y, Vartiainen, NE, Ying, W, Chan, PH, Koistinaho, J & Swanson, RA 2001, 'Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism', *J Neurochem*, vol. 77, no. 6, pp. 1601–1610.

- Coyle, JT, Price, DL & DeLong, MR 1983, 'Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation', *Science*, vol. 219, no. 4589, pp. 1184–1190.
- Cynis, H, Scheel, E, Saido, TC, Schilling, S & Demuth, H 2008, 'Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid- β ', *Biochemistry*, vol. 47, no. 28, pp. 7405–7413.
- Danton, GH & Dietrich, WD 2003, 'Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke', *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 62, no. 2, pp. 127–136.
- Davies, P & Maloney, AJ 1976, 'Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease', *Lancet*, vol. 2, no. 8000, p. 1403.
- del Rio Hortega, P 1932, 'Microglia' in *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, ed W Penfield, Hoeber, New York, pp. 482–534.
- Deutsch, JA 1971, 'The cholinergic synapse and the site of memory', *Science*, vol. 174, no. 4011, pp. 788–794.
- Eddleston, M & Mucke, L 1993, 'Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease', *Neuroscience*, vol. 54, no. 1, pp. 15–36.
- Eng, LF, Ghirnikar, RS & Lee, YL 2000, 'Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)', *Neurochem Res*, vol. 25, 9-10, pp. 1439–1451.
- Farina, C, Aloisi, F & Meinl, E 2007, 'Astrocytes are active players in cerebral innate immunity', *Trends Immunol*, vol. 28, no. 3, pp. 138–145.
- Fodero-Tavoletti, MT, Villemagne, VL, Rowe, CC, Masters, CL, Barnham, KJ & Cappai, R 2011, 'Amyloid- β : the seeds of darkness', *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 43, no. 9, pp. 1247–1251.
- Franklin, KBJ & Paxinos, G 1997, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego.
- Goedert, M & Spillantini, MG 2011, 'Pathogenesis of the Tauopathies', *J Mol Neurosci*, vol. 45, no. 3, pp. 425–431.
- Gordon, GRJ, Mulligan, SJ & MacVicar, BA 2007, 'Astrocyte control of the cerebrovasculature', *Glia*, vol. 55, no. 12, pp. 1214–1221.
- Hall, ED, Oostveen, JA, Dunn, E & Carter, DB 1995, 'Increased amyloid protein precursor and apolipoprotein E immunoreactivity in the selectively vulnerable hippocampus following transient forebrain ischemia in gerbils', *Exp Neurol*, vol. 135, no. 1, pp. 17–27.
- Hardy, JA & Higgins, GA 1992, 'Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis', *Science*, vol. 256, no. 5054, pp. 184–185.
- Hartlage-Rübsamen, M, Morawski, M, Waniek, A, Jager, C, Zeitschel, U, Koch, B, Cynis, H, Schilling, S, Schliebs, R, Demuth, H & Rossner, S 2011, 'Glutaminyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu)-Abeta deposits in hippocampus via distinct cellular mechanisms', *Acta Neuropathol*, vol. 121, no. 6, pp. 705–719.
- Hartlage-Rübsamen, M, Staffa, K, Waniek, A, Wermann, M, Hoffmann, T, Cynis, H, Schilling, S, Demuth, H & Rossner, S 2009, 'Developmental expression and subcellular localization of glutaminyl cyclase in mouse brain', *Int J Dev Neurosci*, vol. 27, no. 8, pp. 825–835.

- Hartlage-Rübsamen, M, Zeitschel, U, Apelt, J, Gartner, U, Franke, H, Stahl, T, Gunther, A, Schliebs, R, Penkowa, M, Bigl, V & Rossner, S 2003, 'Astrocytic expression of the Alzheimer's disease β -secretase (BACE1) is stimulus-dependent', *Glia*, vol. 41, no. 2, pp. 169–179.
- Hatten, ME, Liem, RK, Shelanski, ML & Mason, CA 1991, 'Astroglia in CNS injury', *Glia*, vol. 4, no. 2, pp. 233–243.
- Heneka, MT, Rodríguez, JJ & Verkhratsky, A 2010, 'Neuroglia in neurodegeneration', *Brain Research Reviews*, vol. 63, no. 1-2, pp. 189–211.
- Henon, H, Durieu, I, Guerouaou, D, Lebert, F, Pasquier, F & Leys, D 2001, 'Poststroke dementia: incidence and relationship to prestroke cognitive decline', *Neurology*, vol. 57, no. 7, pp. 1216–1222.
- He, W & Barrow, CJ 1999, 'The A β 3-Pyroglutamyl and 11-Pyroglutamyl Peptides Found in Senile Plaque Have Greater β -Sheet Forming and Aggregation Propensities in Vitro than Full-Length A β ', *Biochemistry*, vol. 38, no. 33, pp. 10871–10877.
- Hyman, BT, van Hoesen, GW, Damasio, AR & Barnes, CL 1984, 'Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation', *Science*, vol. 225, no. 4667, pp. 1168–1170.
- Iadecola, C & Nedergaard, M 2007, 'Glial regulation of the cerebral microvasculature', *Nat Neurosci*, vol. 10, no. 11, pp. 1369–1376.
- Itagaki, S, McGeer, PL, Akiyama, H, Zhu, S & Selkoe, D 1989, 'Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease', *J Neuroimmunol*, vol. 24, no. 3, pp. 173–182.
- Iwatsubo, T, Odaka, A, Suzuki, N, Mizusawa, H, Nukina, N & Ihara, Y 1994, 'Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43)', *Neuron*, vol. 13, no. 1, pp. 45–53.
- Kanemitsu, H, Nakagomi, T, Tamura, A, Tsuchiya, T, Kono, G & Sano, K 2002, 'Differences in the extent of primary ischemic damage between middle cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models', *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 22, no. 10, pp. 1196–1204.
- Kato, H, Kogure, K, Liu, XH, Araki, T, Kato, K & Itoyama, Y 1995, 'Immunohistochemical localization of the low molecular weight stress protein HSP27 following focal cerebral ischemia in the rat', *Brain Res*, vol. 679, no. 1, pp. 1–7.
- Kato, H, Liu, Y, Kogure, K & Kato, K 1994, 'Induction of 27-kDa heat shock protein following cerebral ischemia in a rat model of ischemic tolerance', *Brain Res*, vol. 634, no. 2, pp. 235–244.
- Ke, YD, Suchowerska, AK, van der Hoven, J, Silva, DM de, Wu, CW, van Eersel, J, Ittner, A & Ittner, LM 2012, 'Lessons from Tau-Deficient Mice', *Int J Alzheimers Dis*, vol. 2012, pp. 1–8.
- Kim, SU & Vellis, J de 2005, 'Microglia in health and disease', *J Neurosci Res*, vol. 81, no. 3, pp. 302–313.
- Kitagawa, K, Matsumoto, M, Yang, G, Mabuchi, T, Yagita, Y, Hori, M & Yanagihara, T 1998, 'Cerebral ischemia after bilateral carotid artery occlusion and intraluminal suture occlusion in mice: evaluation of the patency of the posterior communicating artery', *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 18, no. 5, pp. 570–579.

- Kreutzberg, GW 1996, 'Microglia: a sensor for pathological events in the CNS', *Trends Neurosci, Special Issue: Glial Signalling*, vol. 19, no. 8, pp. 312–318.
- Leis, JA, Bekar, LK & Walz, W 2005, 'Potassium homeostasis in the ischemic brain', *Glia*, vol. 50, no. 4, pp. 407–416.
- Lemke, R, Hartig, W, Rossner, S, Bigl, V & Schliebs, R 1998, 'Interleukin-6 is not expressed in activated microglia and in reactive astrocytes in response to lesion of rat basal forebrain cholinergic system as demonstrated by combined in situ hybridization and immunocytochemistry', *J Neurosci Res*, vol. 51, no. 2, pp. 223–236.
- Leys, D, Henon, H, Mackowiak-Cordoliani, M & Pasquier, F 2005, 'Poststroke dementia', *Lancet Neurol*, vol. 4, no. 11, pp. 752–759.
- Li, L, Lundkvist, A, Andersson, D, Wilhelmsson, U, Nagai, N, Pardo, AC, Nodin, C, Stahlberg, A, Aprico, K, Larsson, K, Yabe, T, Moons, L, Fotheringham, A, Davies, I, Carmeliet, P, Schwartz, JP, Pekna, M, Kubista, M, Blomstrand, F, Maragakis, N, Nilsson, M & Pekny, M 2008, 'Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia', *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 28, no. 3, pp. 468–481.
- Longa, EZ, Weinstein, PR, Carlson, S & Cummins, R 1989, 'Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats', *Stroke*, vol. 20, no. 1, pp. 84–91.
- Lopes, KO, Sparks, DL & Streit, WJ 2008, 'Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity', *Glia*, vol. 56, no. 10, pp. 1048–1060.
- Lue, L, Kuo, Y, Beach, T & Walker, DG 2010, 'Microglia Activation and Anti-inflammatory Regulation in Alzheimer's Disease', *Mol Neurobiol*, vol. 41, no. 2-3, pp. 115–128.
- Masters, CL, Cappai, R, Barnham, KJ & Villemagne, VL 2006, 'Molecular mechanisms for Alzheimer's disease: implications for neuroimaging and therapeutics', *J Neurochem*, vol. 97, no. 6, pp. 1700–1725.
- Mawuenyega, KG, Sigurdson, W, Ovod, V, Munsell, L, Kasten, T, Morris, JC, Yarasheski, KE & Bateman, RJ 2010, 'Decreased Clearance of CNS β -Amyloid in Alzheimer's Disease', *Science*, vol. 330, no. 6012, p. 1774.
- McLean, CA, Cherny, RA, Fraser, FW, Fuller, SJ, Smith, MJ, Beyreuther, K, Bush, AI & Masters, CL 1999, 'Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease', *Ann Neurol*, vol. 46, no. 6, pp. 860–866.
- Medeiros, R & LaFerla, FM 2013, 'Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony', *Experimental Neurology*, vol. 239, pp. 133–138.
- Min, K, Yang, M, Kim, S, Jou, I & Joe, E 2006, 'Astrocytes induce hemoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation', *J Neurosci*, vol. 26, no. 6, pp. 1880–1887.
- Morawski, M, Hartlage-Rubsamen, M, Jager, C, Waniek, A, Schilling, S, Schwab, C, McGeer, PL, Arendt, T, Demuth, H & Rossner, S 2010, 'Distinct glutaminyl cyclase expression in Edinger-Westphal nucleus, locus coeruleus and nucleus basalis Meynert contributes to pGlu-A β pathology in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathol*, vol. 120, no. 2, pp. 195–207.

- Morris, JC & Price, JL 2001, 'Pathologic correlates of nondemented aging, mild cognitive impairment, and early-stage Alzheimer's disease', *J Mol Neurosci*, vol. 17, no. 2, pp. 101–118.
- Nagele, RG, Wegiel, J, Venkataraman, V, Imaki, H, Wang, K & Wegiel, J 2004, 'Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, vol. 25, no. 5, pp. 663–674.
- Nakajima, K & Kohsaka, S 1993, 'Functional roles of microglia in the brain', *Neuroscience Research*, vol. 17, no. 3, pp. 187–203.
- Nedergaard, M, Ransom, B & Goldman, SA 2003, 'New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain', *Trends Neurosci*, vol. 26, no. 10, pp. 523–530.
- Nihashi, T, Inao, S, Kajita, Y, Kawai, T, Sugimoto, T, Niwa, M, Kabeya, R, Hata, N, Hayashi, S & Yoshida, J 2001, 'Expression and distribution of beta amyloid precursor protein and beta amyloid peptide in reactive astrocytes after transient middle cerebral artery occlusion', *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 143, no. 3, pp. 287–295.
- Nussbaum, JM, Schilling, S, Cynis, H, Silva, A, Swanson, E, Wangsanut, T, Tayler, K, Wiltgen, B, Hatami, A, Ronicke, R, Reymann, K, Hutter-Paier, B, Alexandru, A, Jagla, W, Graubner, S, Glabe, CG, Demuth, H & Bloom, GS 2012, 'Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β ', *Nature*, vol. 485, no. 7400, pp. 651–655.
- Palacios, G, Mengod, G, Tortosa, A, Ferrer, I & Palacios, JM 1995, 'Increased β -amyloid precursor protein expression in astrocytes in the gerbil hippocampus following ischaemia: association with proliferation of astrocytes', *Eur J Neurosci*, vol. 7, no. 3, pp. 501–510.
- Parpura, V, Heneka, MT, Montana, V, Oliet, SHR, Schousboe, A, Haydon, PG, Stout, RF, JR, Spray, DC, Reichenbach, A, Pannicke, T, Pekny, M, Pekna, M, Zorec, R & Verkhratsky, A 2012, 'Glial cells in (patho)physiology', *J Neurochem*, vol. 121, no. 1, pp. 4–27.
- Pasquier, F & Leys, D 1997, 'Why are stroke patients prone to develop dementia?', *J Neurol*, vol. 244, no. 3, pp. 135–142.
- Paxinos, G & Watson, C 1986, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, Sydney; Orlando.
- Pekny, M & Nilsson, M 2005, 'Astrocyte activation and reactive gliosis', *Glia*, vol. 50, no. 4, pp. 427–434.
- Perea, G, Navarrete, M & Araque, A 2009, 'Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information', *Trends Neurosci*, vol. 32, no. 8, pp. 421–431.
- Perrin, RJ, Fagan, AM & Holtzman, DM 2009, 'Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease', *Nature*, vol. 461, no. 7266, pp. 916–922.
- Perry, EK, Tomlinson, BE, Blessed, G, Bergmann, K, Gibson, PH & Perry, RH 1978, 'Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia', *Br Med J*, vol. 2, no. 6150, pp. 1457–1459.
- Popp, A, Jaenisch, N, Witte, OW & Frahm, C 2009, 'Identification of ischemic regions in a rat model of stroke', *PLoS One*, vol. 4, no. 3, pp. e4764.

- Roberson, ED, Scarce-Levie, K, Palop, JJ, Yan, F, Cheng, IH, Wu, T, Gerstein, H, Yu, G & Mucke, L 2007, 'Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model', *Science*, vol. 316, no. 5825, pp. 750–754.
- Rogers, J, Strohmeier, R, Kovelowski, C & Li, R 2002, 'Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid β peptide', *Glia*, vol. 40, no. 2, pp. 260–269.
- Rossi, DJ, Brady, JD & Mohr, C 2007, 'Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia', *Nat Neurosci*, vol. 10, no. 11, pp. 1377–1386.
- Rossner, S, Hartig, W, Schliebs, R, Bruckner, G, Brauer, K, Perez-Polo, JR, Wiley, RG & Bigl, V 1995, '192IgG-saporin immunotoxin-induced loss of cholinergic cells differentially activates microglia in rat basal forebrain nuclei', *J Neurosci Res*, vol. 41, no. 3, pp. 335–346.
- Rossner, S, Sastre, M, Bourne, K & Lichtenthaler, SF 2006, 'Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease', *Prog Neurobiol*, vol. 79, no. 2, pp. 95–111.
- Russo, C, Violani, E, Salis, S, Venezia, V, Dolcini, V, Damonte, G, Benatti, U, D'Arrigo, C, Patrone, E, Carlo, P & Schettini, G 2002, 'Pyroglutamate-modified amyloid β -peptides - A β N3(pE) - strongly affect cultured neuron and astrocyte survival', *J Neurochem*, vol. 82, no. 6, pp. 1480–1489.
- Saido, TC 1998, 'Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of β -amyloid', *Neurobiol Aging*, vol. 19, 1 Suppl, pp. S69-75.
- Saido, TC, Iwatsubo, T, Mann, DM, Shimada, H, Ihara, Y & Kawashima, S 1995, 'Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques', *Neuron*, vol. 14, no. 2, pp. 457–466.
- Savva, GM & Stephan, BCM 2010, 'Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review', *Stroke*, vol. 41, no. 1, pp. e41-46.
- Schilling, S, Appl, T, Hoffmann, T, Cynis, H, Schulz, K, Jagla, W, Friedrich, D, Wermann, M, Buchholz, M, Heiser, U, Horsten, S von & Demuth, H 2008a, 'Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-A β formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ', *J Neurochem*, vol. 106, no. 3, pp. 1225–1236.
- Schilling, S, Hoffmann, T, Manhart, S, Hoffmann, M & Demuth, H 2004, 'Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions', *FEBS Lett*, vol. 563, no. 1-3, pp. 191–196.
- Schilling, S, Lauber, T, Schaupp, M, Manhart, S, Scheel, E, Böhm, G & Demuth, H 2006, 'On the Seeding and Oligomerization of pGlu-Amyloid Peptides (in vitro)', *Biochemistry*, vol. 45, no. 41, pp. 12393–12399.
- Schilling, S, Zeitschel, U, Hoffmann, T, Heiser, U, Francke, M, Kehlen, A, Holzer, M, Hutter-Paier, B, Prokesch, M, Windisch, M, Jagla, W, Schlenzig, D, Lindner, C, Rudolph, T, Reuter, G, Cynis, H, Montag, D, Demuth, H & Rossner, S 2008b, 'Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology', *Nat Med*, vol. 14, no. 10, pp. 1106–1111.
- Schliebs, R & Arendt, T 2006, 'The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease', *J Neural Transm*, vol. 113, no. 11, pp. 1625–1644.

- Schliebs, R & Arendt, T 2011, 'The cholinergic system in aging and neuronal degeneration', *Behav. Brain Res.*, vol. 221, no. 2, pp. 555–563.
- Sieber, MW, Guenther, M, Kohl, M, Witte, OW, Claus, RA & Frahm, C 2010, 'Inter-age variability of bona fide unvaried transcripts Normalization of quantitative PCR data in ischemic stroke', *Neurobiol Aging*, vol. 31, no. 4, pp. 654–664.
- Silver, J & Miller, JH 2004, 'Regeneration beyond the glial scar', *Nat Rev Neurosci*, vol. 5, no. 2, pp. 146–156.
- Sjogren, M, Vanderstichele, H, Agren, H, Zachrisson, O, Edsbacke, M, Wikkelso, C, Skoog, I, Wallin, A, Wahlund, LO, Marcusson, J, Nagga, K, Andreasen, N, Davidsson, P, Vanmechelen, E & Blennow, K 2001, 'Tau and A β 42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values', *Clin Chem*, vol. 47, no. 10, pp. 1776–1781.
- Skaper, SD 2007, 'The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies', *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1122, pp. 23–34.
- Sofroniew, MV 2009, 'Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation', *Trends Neurosci*, vol. 32, no. 12, pp. 638–647.
- Sofroniew, MV & Vinters, HV 2010, 'Astrocytes: biology and pathology', *Acta Neuropathol*, vol. 119, no. 1, pp. 7–35.
- Streit, WJ 2002, 'Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS', *Glia*, vol. 40, no. 2, pp. 133–139.
- Streit, WJ 2004, 'Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis', *J. Neurosci. Res.*, vol. 77, no. 1, pp. 1–8.
- Streit, WJ, Braak, H, Xue, Q & Bechmann, I 2009, 'Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathol*, vol. 118, no. 4, pp. 475–485.
- Streit, WJ, Mrak, RE & Griffin, WST 2004, 'Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective', *J Neuroinflammation*, vol. 1, no. 1, p. 14.
- Takano, T, Oberheim, N, Cotrina, ML & Nedergaard, M 2009, 'Astrocytes and ischemic injury', *Stroke*, vol. 40, 3 Suppl, pp. S8-12.
- Tamura, A, Graham, DI, McCulloch, J & Teasdale, GM 1981, 'Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion', *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 1, no. 1, pp. 53–60.
- van Rossum, D & Hanisch, U 2004, 'Microglia', *Metab Brain Dis*, vol. 19, no. 3-4, pp. 393–411.
- Verkhratsky, AN & Butt, A 2013, *Glial physiology and pathophysiology*, Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex.
- Whitehouse, PJ, Price, DL, Struble, RG, Clark, AW, Coyle, JT & Delon, MR 1982, 'Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain', *Science*, vol. 215, no. 4537, pp. 1237–1239.

- Wirhth, O, Breyhan, H, Cynis, H, Schilling, S, Demuth, H & Bayer, TA 2009, 'Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model', *Acta Neuropathol*, vol. 118, no. 4, pp. 487–496.
- Wong, P, Savonenko, A, Li, T & Price, D 2012, 'Neurobiology of Alzheimer's Disease' in *Basic neurochemistry. principles of molecular, cellular and medical neurobiology*, ed Brady, ST & Siegel, GJ, Elsevier, Academic Press, Amsterdam ; Heidelberg [u.a.], pp. 815–828.
- Zhang, Z, Chopp, M & Powers, C 1997, 'Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion', *Brain Res*, vol. 744, no. 2, pp. 189–198.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

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

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Steffen Roßner für die fachlich und zwischenmenschlich sehr gute Betreuung und dafür, dass er stets für meine Fragen zur Verfügung stand. Ich danke ihm für viele lehrreiche Gespräche und gute Ratschläge zu meiner Dissertation.

Desweiteren möchte ich Frau Dr. Maike Hartlage-Rübsamen, sowie Herrn Alexander Waniek für die gute Einführung in die Methoden der Immunhistochemie und Mikroskopie, sowie für ihren fachmännischen Blick auf meine angefertigten Präparate danken.

Herrn Anssi Siikanen danke ich vielmals für die Durchführung der stereotaktischen Mikroinjektion von 192-IgG-SAP und die Vorbereitung der Ratten. Der Arbeitsgruppe Frahm der neurologischen Abteilung der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die Induktion einer Ischämie durch MCAO und die Bereitstellung der Mäuse für meine Versuchsreihe.

Mein besonderer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe für molekulare und zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Arendt für das angenehme Arbeitsklima und die schnelle, kompetente Hilfe bei fachlichen Fragen.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meinem Freund, meiner Familie und meinen Freunden dafür bedanken, dass sie mich in der Zeit meines Studiums und der Anfertigung meiner Dissertation so sehr unterstützt haben und mir bei allen Problemen zur Seite standen.