

Aus dem Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Morphologie der Mikroglia in Assoziation zu Amyloidablagerungen und
Tau-Pathologien im caninen Gehirn**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Franziska Schmidt
aus Leipzig

Leipzig, 2014

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Johannes Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Johannes Seeger, Veterinär-Anatomisches Institut,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner, Ph.D., Institut für Pathologie,
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 09.09.2014

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Das canine kognitive Dysfunktionssyndrom	3
2.2 Pathogenese der Proteinablagerungen.....	4
2.2.1 Amyloid-Pathologie	4
2.2.2 Tau-Pathologie.....	9
2.3 Mikroglia.....	11
2.3.1 Ursprung und Formen.....	12
2.3.2 Die Rolle der Mikroglia beim Morbus Alzheimer	13
2.4 Assoziation des CCDS zum Morbus Alzheimer.....	17
3 Tiere, Material und Methoden.....	19
3.1 Hunde.....	19
3.2 Gehirnproben	20
3.2.1 Gewinnung und Kryofixierung der Gehirne	20
3.2.2 Makroskopische Untersuchung der Gehirne.....	20
3.2.3 Untersuchte Gehirnregionen	21
3.2.4 Histologische Färbungen	22
3.3 Immunohistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen	23
3.3.1 Antikörper und Seren.....	24
3.3.2 Protokoll der ABC-Methode	26
3.3.3 Protokoll zur Immunfluoreszenz.....	27
3.3.4 Kontrollen.....	29
3.4 Auswertung der Färbungen.....	29
3.4.1 Deskriptive Analyse der Präparate.....	29
3.4.2 Quantitative Analyse der immunhistochemischen Befunde	31
3.4.3 Statistische Auswertung.....	32
4 Ergebnisse.....	34
4.1 Anamnestische Merkmale der Hunde	34
4.1.1 Gruppeneinteilung in Größen- und Gewichtskategorien	34
4.1.2 Altersverteilung	34

Inhaltsverzeichnis

4.1.3	Symptomatik	35
4.2	Pathologisch-histologische Untersuchung der Gehirne	35
4.2.1	Altersabhängige pathologische Gehirnveränderungen	35
4.2.2	Anteil der grauen Substanz des frontalen Kortex.....	36
4.2.3	Pathologisch-histologische Charakterisierung ausgewählter Hirnareale	37
4.2.3.1	Kontrollgruppe	37
4.2.3.2	Gehirne der alten Hunde	38
4.2.3.3	Korrelation der altersassoziierten Neuropathologie mit der Größen- und Gewichtskategorie.....	39
4.2.3.4	Statistische Auswertung	40
4.3	Detektion, Charakterisierung und Quantifizierung des A β -Proteins	40
4.3.1	Immunhistochemische Darstellung des A β -Proteins.....	40
4.3.1.1	Kontrollgruppe	40
4.3.1.2	Altersassoziierte Verteilung der A β -Ablagerungen.....	41
4.3.2	Morphologie der A β -Ablagerungen	47
4.3.3	Assoziation der A β -Ablagerungen mit der Größen- und Gewichtskategorie	51
4.3.4	Histochemische Darstellung des A β -Proteins	51
4.3.5	Quantifizierung der A β -Ablagerungen.....	52
4.4	Immunhistologische Darstellung von Tau-Pathologien.....	57
4.4.1	Kontrollgruppe.....	57
4.4.2	Alte Hunde der Versuchsgruppen	57
4.5	Charakterisierung und Quantifizierung der Mikroglia.....	60
4.5.1	Darstellung der Mikroglia	60
4.5.1.1	Kontrollgruppe	60
4.5.1.2	Alte Hunde der Versuchsgruppen	62
4.5.2	Assoziation der mikroglialen Morphologie zu den Größen- und Gewichtskategorien der untersuchten Hunde	70
4.5.3	Auswertung morphologischer Parameter mit dem Filament Tracer	70
4.5.4	Quantifizierung der Mikroglia	72

Inhaltsverzeichnis

4.5.4.1	Untersuchung der Anzahl der Mikroglia in Assoziation zur Neuropathologie	72
4.5.4.2	Untersuchung der Anzahl der Mikroglia in Assoziation zu den Größen- und Gewichtskategorien.....	74
4.5.5	Nachweis HLA DR-positiver Mikroglia	76
4.5.5.1	Kontrollgruppe.....	76
4.5.5.2	Alte Versuchshunde	77
5	Diskussion	81
5.1	Hundepopulation	81
5.2	Pathologisch-histologische Untersuchung der Gehirne.....	82
5.3	A β -Pathologie.....	84
5.3.1	Parenchymale A β -Plaques	84
5.3.2	Gefäßassoziiertes A β -Protein	86
5.4	Tau-Pathologie	86
5.4.1	Häufigkeit innerhalb der Hundepopulation und kritische Wertung der Färbemethodik.....	86
5.4.2	Zusammenhang der Tau-Pathologie mit den A β -Ablagerungen	88
5.5	Mikroglia.....	89
5.5.1	Unterschiede in der Anzahl der Mikroglia zwischen jungen und alten Hunden.....	89
5.5.2	Unterschiede der Morphologie der Mikroglia zwischen jungen und alten Hunden.....	90
5.5.3	Detektion von dystrophischen Mikroglia in den Gehirnen von alten Hunden.....	92
5.6	Schlussfolgerungen.....	93
5.7	Ausblick.....	96
6	Zusammenfassung	97
7	Summary	99
8	Literaturverzeichnis	101
9	Anhang	118
9.1	Tabellarische Übersichten zu den Studientieren	118
9.2	Protokoll der H&E-Färbung	120

Inhaltsverzeichnis

9.3 Übersicht einzelner Ergebnisse des humanen Gewebes	121
9.4 Tabellarische Übersichten der verwendeten Materialien	121
Abbildungsverzeichnis	133
Tabellenverzeichnis	135

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-biotinylierte-Peroxidase-Komplex-Methode (engl. <u>a</u> vidin <u>b</u> iotin <u>c</u> omplex)
A β	Amyloid mit beta-Faltblattstruktur
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <u>a</u> nalysis of <u>v</u> ariance)
APP	Amyloidvorläufermolekül (engl. <u>a</u> myloid <u>p</u> recursor <u>p</u> rotein)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	beziehungsweise
CAA	zerebrale Amyloidangiopathie (engl. <u>c</u> erebral <u>a</u> myloid <u>a</u> ngiopathy)
CCDS	canines kognitives Dysfunktionssyndrom (engl. <u>c</u> anine <u>c</u> ognitive <u>d</u> ysfunction <u>s</u> ndrome)
Cy3	Cyanin 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DABNi	3,3'-Diaminobenzidinlösung mit Nickelammonium- sulfat versetzt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
engl.	englisch
eK	entorhinaler Kortex
fK	frontaler Kortex
GC	Glutyminylcyclase
H&E	Hämatoxylin und Eosin-Färbung
Hk	Hippokampus
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Kategorien S, M und L	kleine (engl. <u>s</u> mall), mittelgroße (engl. <u>m</u> edium) und große (engl. <u>l</u> arge) Hunde
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
Ko	Kontrollgruppe

Abkürzungsverzeichnis

HLA DR	Humanes Leukozyten Antigen vom Isotyp DR
M	Molar
MHC I und II	Histo-Kompatibilitäts-Antigen Klasse I und II (engl. <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
NaOH	Natriumhydroxid
NFT	neurofibrilläre Bündel (engl. <u>n</u> euro <u>f</u> ibrillary <u>t</u> angles)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni	Nickelammoniumsulfat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween [®] 20
PHF	paarige helikale Filamente
p.m.	post mortem
pE3Aβ, pE11Aβ	Pyroglutamat an Position 3 oder 11 des Aβ
PFA	Paraformaldehyd
pSer	phosphoryliertes Serin
pThr	phosphoryliertes Threonin
Tab.	Tabelle
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Hunde entwickeln mit zunehmendem Alter ein kognitives Dysfunktionssyndrom, das in vielen Aspekten einer beginnenden Alzheimer-Krankheit beim Menschen ähnelt. In bestimmten Gehirnregionen entwickeln sich aus Amyloid- ($A\beta$ -) Peptiden bestehende Plaques und gefäßassoziierte Ablagerungen. Beim Menschen lagern sich im initialen Stadium insbesondere stark zytotoxische pyroglutamylierte $A\beta$ -Peptide ab. Indem es die Ablagerung anderer $A\beta$ -Subtypen wie dem $A\beta_{x-40}$ und $A\beta_{x-42}$ fördert, trägt es wesentlich zum progressiven Verlauf der Erkrankung bei. Ein weiteres charakteristisches Merkmal des Morbus Alzheimer ist die Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Tau Proteins, wodurch es sich von den Mikrofilamenten löst und intraneuronal akkumuliert. Dies führt zu Einschränkungen der Funktionalität und schließlich zur Degeneration der Neuronen. Neuere Studien stützen zudem die Hypothese, dass Proteinablagerungen im Gehirnparenchym trophische Eigenschaften der Mikroglia beeinträchtigen. Altersassoziiert und im Zuge neurodegenerativer Erkrankungen treten weitere Veränderungen der Mikroglia auf. Diese sogenannten seneszenten Mikroglia zeichnen sich durch spezifische morphologische Merkmale aus und treten vermehrt bei Morbus Alzheimer und beim Down-Syndrom auf (STREIT et al., 2009).

In den Gehirnen von alten Hunden wurden $A\beta$ -Peptide gehäuft beobachtet und gingen teilweise mit kognitiven Dysfunktionen einher. Trotz zahlreicher Studien zur Verteilung und Morphologie der caninen Plaques (CUMMINGS et al., 1996b; HEAD et al., 2000; NAKAYAMA et al., 2001), existierten bisher keine Untersuchungen über das Vorhandensein von pyroglutamylierten $A\beta$ -Ablagerungen bei alten Hunden. Vor diesem Hintergrund bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, parenchymale und gefäßassoziierte Ablagerungen in den Gehirnen von alten Hunden morphologisch und anhand stereologischer Methoden zu analysieren. Hyperphosphoryliertes Tau Protein und dessen intraneuronale Ablagerungen wurden selten in den Gehirnen von Hunden beobachtet (PAPAIOANNOU et al., 2001). Einige Autoren vertreten die Meinung, dass im caninen Gehirn keine Akkumulation des pathologischen Tau Proteins stattfindet (CUMMINGS et al.; 1996a, NAKAYAMA et al., 2004). Auch über das Verhalten der Mikroglia bei alten Hunden existieren in der Literatur kontroverse Aussagen.

Einleitung

Dabei wird diskutiert, ob eine altersassoziierte Aktivierung der Mikroglia ähnlich wie beim Menschen erfolgt. Einen Einblick in die Pathogenese der Proteinablagerungen sowie deren Auswirkung auf Mikroglia sollten Untersuchungen über Vorkommen und Verteilung von A β - und Tau-Pathologien und die Morphologie der Mikroglia geben.

Ein Großteil der in der Literatur genannten Ergebnisse stammt von Laborhunden, vornehmlich Beagles. Den wenigen Studien, die an einer Vielzahl von Rasse- und Mischlingshunden durchgeführt wurden, fehlt eine Unterteilung der Tiere nach Größe beziehungsweise Gewicht und der damit assoziierten Lebensspanne. Im Hinblick auf das Auftreten und die Schwere des Syndroms bei Hunden stellt dies eine Einschränkung unseres Wissens über den Hund als Modelltier neurodegenerativer Erkrankungen dar. Neben der Darstellung wesentlicher pathologischer Komponenten des Syndroms und einer assoziierten Veränderung der Mikroglia war es ein wichtiges Anliegen dieser Arbeit, die erhobenen Daten hinsichtlich der verschiedenen Größen und Gewichte der Hunde zu interpretieren und zu evaluieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Das canine kognitive Dysfunktionssyndrom

Bei geriatrischen Hunden kommt es häufig zu Verhaltensauffälligkeiten, die mit neurodegenerativen Schädigungen des Gehirns einhergehen und unter dem Begriff „canines kognitives Dysfunktionssyndrom“ (CCDS) zusammengefasst werden. Betroffene Tiere zeigen eine Vielzahl an Veränderungen, wobei vorrangig kognitive Defizite auftreten. Die Tiere sind in ihrer sozialen Interaktion gegenüber ihrem Besitzer und gegenüber Artgenossen verändert, ihre Auffassungsgabe ist verringert und sie zeigen ein vermindertes Aktivitätslevel. Auch von Desorientierung in vertrauter Umgebung, teilweiser Verwirrung und einem gestörten Schlaf-Wach-Zyklus wird berichtet. Des Weiteren können mit Verlauf des Syndroms Inkontinenz und ein gesteigerter oder verminderter Appetit auftreten (SIWAK et al., 2001; LANDSBERG & ARAUJO, 2005).

Die Prävalenz des CCDS lag bei 325 Hunden älter als 9 Jahre bei 22,5 %, wobei weibliche und kastrierte Tiere beider Geschlechter schwerer betroffen waren (AZKONA et al., 2009). In einer weiteren Studie mit 180 Hunden zeigten 28 % der 11 bis 12 Jahre alten Tiere und 68 % der 15 bis 16 Jährigen ein oder mehrere Symptome der Erkrankung (NEILSON et al., 2001). Die Symptome des CCDS nehmen sukzessiv mit weiterem Krankheitsverlauf zu (BAIN et al., 2001). Dennoch handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose (LANDSBERG & ARAUJO, 2005), die gestellt wird, wenn ein alter Hund wenigstens eins der genannten Symptome mindestens einmal pro Woche zeigt (NEILSON et al., 2001).

Bei post-mortem-Untersuchungen zeigten sich charakteristische neuropathologische Läsionen im Gehirn, deren Formation bereits vor der klinischen Symptomatik begann (SARASA & PESINI, 2009). Das Hauptmerkmal des Syndroms, die parenchymale und gefäßassoziierte Ablagerung von abnormal gefalteten Amyloid- β (A β), wurde erstmals 1956 beschrieben (VON BRAUNMÜHL, 1956). Weitere histopathologische Merkmale umfassen die Degeneration von Purkinjezellen im Kleinhirn (PUGLIESE et al., 2007) sowie von serotonergen (BERNEDO et al., 2009), noradrenergen (INSUA et al., 2010) und cholinergen (INSUA et al., 2012) Neuronen und seltener, die Hyperphosphorylierung mit

intraneuronaler Akkumulation des Tauproteins (NAKAYAMA et al., 2004; YU et al., 2011). Altersassoziiert können auch Atrophien der grauen Substanz (ROFINA et al., 2006), Erweiterungen der Ventrikel (GONZÁLEZ-SORIANO et al., 2001; SU et al., 1998), Kalzifizierungen der Meningen, Gefäßfibrosen (BORRÀS et al., 1999), eine verminderte hippocampale Neurogenese (PEKCEC et al., 2008) und Lipofuszinablagerungen in Neuronen, Gliazellen und Makrophagen (CUMMINGS et al., 1996a; ROFINA et al., 2006) auftreten.

2.2 Pathogenese der Proteinablagerungen

2.2.1 Amyloid-Pathologie

A β ist ein Produkt der amyloidogenen Spaltung des 110 - 135 kDa großen Amyloidvorläufermoleküls (APP) (SELKOE et al., 1988; HAASS et al., 2012), das transmembranös in Neuronen aller Gehirnregionen vorliegt (SARASA et al., 2010). Die proteolytische Spaltung des APP kann auf zwei Wegen, einer amyloidogenen und einer nicht-amyloidogenen Spaltung erfolgen. Nur bei der amyloidogenen Spaltung entsteht A β . Im Verlauf einer nicht-amyloidogenen Spaltung des APP schneidet das Enzym α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne, wodurch die Freisetzung von A β verhindert wird. Es entsteht das lösliche (engl. soluble) sAPP α , das einen schützenden Effekt auf Nervenzellen ausübt. Aus einer zweiten Spaltung durch die γ -Sekretase resultieren das lösliche Peptid p3 und das intrazelluläre C-terminale Fragment (Abb. 2.1). Die amyloidogene Spaltung des APP erfolgt zunächst am extrazellulär gelegenen Amino-terminalen Ende durch die β -Sekretase, wobei das lösliche Fragment sAPP β ins Parenchym freigesetzt wird. Anschließend spaltet die γ -Sekretase das innerhalb der Zellmembran verbliebene Carboxylende in das C-terminale Fragment und A β (HAASS, 2012). Auf diesem Weg entstehen ca. 4 kDa große A β -Peptide mit einer Länge von 40 und 42 Aminosäuren (HEAD et al., 2010; HOLTZMAN et al., 2011). Ob und welche physiologische Funktion A β -Peptide besitzen ist nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese besagt, dass die Peptide auf Grund ihrer antimikrobiellen Wirkung Bestandteil des hirnternen Immunsystems sind (SOSCIA et al., 2010). Zunächst erfolgt die peridendritische und perisomatische Ablagerung von in sich verflochtenen A β -Fibrillen (TORP et al.,

Literaturübersicht

2000; WIRTHS et al., 2001; NUNTAGIJ et al., 2009), gefolgt von einer extensiven, extrazellulären A β -Akkumulation mit Bildung von Plaques (CUMMINGS et al., 1996b). Dabei ist das stark amyloidogene und neurotoxische A β_{42} aufgrund seiner hohen Tendenz zur Aggregation wesentlich an der Bildung von parenchymalen Plaques beteiligt (YAMAGUCHI et al., 2000). Als Initiator für die Plaquebildung wird jedoch durch die Glutaminylzyklase modifiziertes A β angesehen (JAWHAR et al., 2011). Es formiert sich durch die Zyklisierung der Amino-terminalen Glutaminsäure (E) an Position 3 oder 11 zu Pyroglutamat (pE3 bzw. pE11). Diese Modifikation führt zu einer gesteigerten Tendenz zu aggregieren, sie vermindert zudem die Abbaubarkeit des pEA β und erhöht dessen Neurotoxizität (HARTLAGE-RÜBSAMEN et al., 2011; NUSSBAUM et al., 2012). Es wird vermutet, dass pEA β zudem als Aggregationspunkt für A β_{42} -Oligomere fungiert, die sich um einen zentralen Kern aus pEA β anlagern (HARTLAGE-RÜBSAMEN et al., 2011).

Literaturübersicht

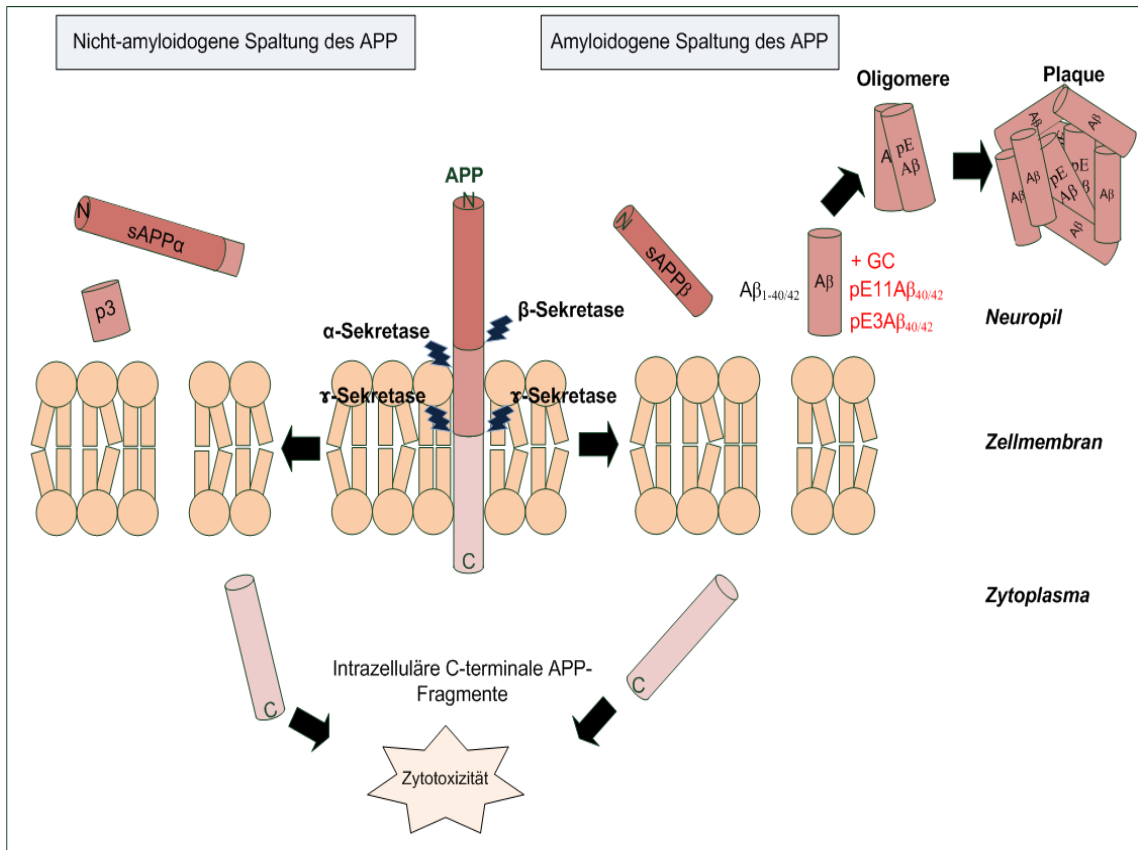


Abb. 2.1: Spaltungswege des APP

Die nicht-amyloidogene Spaltung des APP durch die α - und anschließend durch die γ -Sekretase bringt kein A β hervor. Im Gegensatz dazu entsteht bei der amyloidogenen Spaltung des APP durch die β - und γ -Sekretase neben dem C-terminalen Fragment und dem löslichen sAPP β , das schwer lösliche und zytotoxische extrazelluläre A β -Protein. Modifikationen des A β durch das Enzym Glutaminylzyklase (+ GC) sind entscheidend für die Entstehung des hochgradig toxischen pEA β . Anhäufungen von A β im Neuropil führen zur Akkumulation zu A β -Oligomeren und schließlich zur Formierung seniler Plaques. Modifiziert nach JELLINGER (2001) und HAASS (2012).

In Zellkulturversuchen konnte nachgewiesen werden, dass aus pE3A β_{42} und A β_{1-42} gebildete Oligomere eine sehr viel stärkere Zytotoxizität besaßen als Oligomere, die nur aus A β_{1-42} bestanden (NUSSBAUM et al., 2012). Ob und in welchem Maß pEA β im Gehirn von Hunden vorkommt, ist bisher nicht erforscht worden und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Die Untersuchung der Gehirne von jungen und alten Hunden auf das Vorhandensein von pEA β -Ablagerungen und deren Assoziation zum nicht modifizierten A β stellt dabei einen entscheidenden Schritt dar, um die altersassoziierte Pathologie des

Literaturübersicht

Hundes weiter zu charakterisieren und mögliche Ansatzpunkte für Therapien darzustellen.

Bisherige Untersuchungen zur Formation von Plaques bei Hunden konzentrierten sich auf nicht-modifiziertes A β _{x-40/42}. Dabei beginnt die Formation von extrazellulären A β -Plaques beim Hund an umschriebenen Prädilektionsstellen des präfrontalen und frontalen Kortex und ergreift, mit zunehmenden Schweregrad der Erkrankung, retrograd weitere Felder und Regionen des Gehirns, die neuronale Projektionen von bereits betroffenen Gehirnarealen erhalten (HEAD et al., 2000). Für die verschiedenen Plaqueformen, die in ihrer Gesamtheit als senile Plaques bezeichnet werden, existieren in der Literatur zum Teil unterschiedliche Bezeichnungen. Die vorliegende Arbeit richtet sich nach der Nomenklatur von THAL und BRAAK (2005), die für die beim Menschen beobachteten Plaqueformen erstellt wurde (Abb. 2.2). Welche Plaqueformen in bestimmten Gehirnregionen von alten Individuen lokalisiert sind, ist abhängig vom Stadium der Erkrankung und der Fibroarchitektur des Gewebes (THAL & BRAAK, 2005).

Im Gehirn von alten Hunden bilden sich vorwiegend diffuse Plaques, die sich durch ihre asymmetrische Form und eine homogene Verteilung des A β auszeichnen (CUMMINGS et al., 1996a; MIYAWAKI et al., 2001). Diese Plaqueform findet sich hauptsächlich in den tieferen kortikalen Schichten und kann durch Fusion Durchmesser von bis zu 200 μ m erreichen (HOU et al., 1997; SATOU et al., 1997). Innerhalb der diffusen Plaques können ein oder mehrere Neurone eingebettet sein, die sich pathologisch unauffällig darstellen (ARMSTRONG, 1998; CUMMINGS et al., 1993).

Primitive Plaques sind runde Ablagerungen, bestehend aus fibrillärem A β , die sich meist in den oberflächlichen kortikalen Schichten von Hunden älter als 14 Jahre fanden (HOU et al., 1997; SATOU et al., 1997). Diese Plaqueform weist auf ein Voranschreiten der Pathologie hin und entsteht vermutlich unabhängig von diffusen Ablagerungen, wie Analysen der morphologischen Komplexität der Plaques zeigten (NAKAYAMA et al., 2001).

Im fortgeschrittenen Stadium treten zunehmend kongophile klassische oder im englischen Sprachgebrauch auch „cored plaques“ genannte A β -Ablagerungen auf. Sie sind charakterisiert durch einen zentralen A β -Kern, umgeben von einem helleren Hof und einem peripheren Kranz aus diffusen A β -Ablagerungen.

Literaturübersicht

Oftmals liegen in dem peripheren Kranz argyrophile und A β -positive, dystrophische Neuriten vor (MIYAWAKI et al., 2001; THAL & BRAAK, 2005). Plaques, die ausschließlich aus einem dichten A β -Kern bestehen, werden als „core-only“ oder „burned-out“ Plaques bezeichnet (JELLINGER, 2001; THAL & BRAAK, 2005). Klassische und „core-only“ Plaques wurden bisher nur selten beim Hund beobachtet (MIYAWAKI et al., 2001; ROFINA et al., 2003).

Sogenanntes „fleecy-A β “ ist auf den entorhinalen Kortex beschränkt und besteht aus mehr oder weniger regelmäßig vorliegenden, körnigen A β -Ablagerungen (THAL & BRAAK, 2005).

Als Marklagerplaques werden A β -Ablagerungen der weißen Substanz bezeichnet, die als diffuser oder globulärer Typ vorliegen können. Letztere können mit dystrophischen Neuriten assoziiert sein (THAL & BRAAK, 2005). Diese Plaqueform wurde bisher nicht beim Hund beschrieben.

Eine weitere Gruppe von Plaques, die mit tau-positiven, dystrophischen Neuriten assoziiert ist, wird als neuritische Plaques definiert. Sie können diffus erscheinen oder einen zentralen Kern aus dichten A β enthalten (THAL & BRAAK, 2005) und gehen meist mit einer extensiven Reaktion der Mikroglia einher. Allerdings gelang bisher die Beschreibung von neuritischen Plaques selbst bei Hunden im Alter von 18 bis 23 Jahren nicht (PAPAIOANNOU et al., 2001; PUGLIESE et al., 2006; WEGIEL et al., 1998; YU et al., 2011).

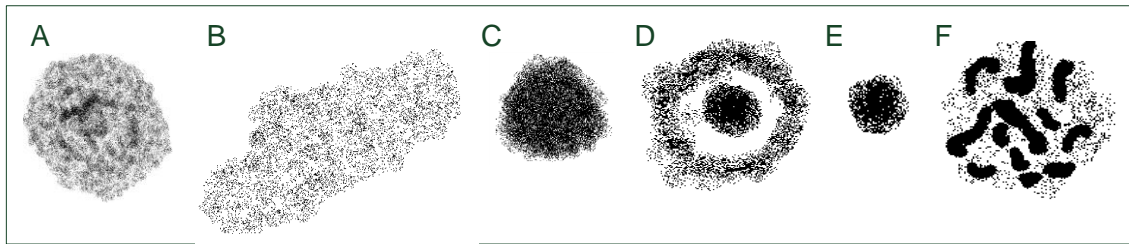


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der verschiedenen A β -Plaques

A) Diffuser Plaque, B) fleecy-A β des entorhinalen Kortex, C) primitiver Plaque, D) klassischer oder „cored“ Plaque, E) „core-only“ oder „burned-out“ Plaque und F) diffuser neuritischer Plaque. Modifiziert nach CZASCH, 2001.

Neben A β als Hauptbestandteil der diversen Plaqueformen können sich weitere Komponenten wie Cathepsine, Ubiquitin, Komplementfaktoren und Apolipoprotein E anlagern (UCHIDA et al., 1997; MIYAWAKI et al., 2001).

Verschiedene Studien mit standardisierten Testfolgen erbrachten den Nachweis, dass die Anzahl der betroffenen Regionen und der vorhandene A β -Gehalt mit dem Auftreten und der Schwere von kognitiven Dysfunktionen bei Hunden korrelieren (COLLE et al., 2000; ROFINA et al., 2006).

Ablagerungen von A β in meningealen und zerebralen Gefäßwänden des caninen Gehirns bestimmen das Krankheitsbild der zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) (GIACCONE et al., 1990; ROFINA et al., 2003), die neben dem CCDS regelmäßig bei alten Hunden beobachtet wird. Die gefäßassoziierten A β -Ablagerungen können zu Läsionen der Gefäßwand führen und Ausgangspunkt für Mikrohäorrhagien sein (WEGIEL et al., 1995). Der Hauptbestandteil dieser Ablagerungen ist das A β ₄₀-Peptid (WISNIEWSKI et al., 1996), dessen Synthese vermutlich in den glatten Muskelzellen der Tunica media von größeren Gefäßen stattfindet (WEGIEL et al., 1995; FRACKOWIAK et al., 1995).

2.2.2 Tau-Pathologie

Parallel zur extrazellulären Ablagerung von A β tritt altersassoziiert eine weitere, Neurone betreffende Proteinpathologie auf (ARMSTRONG, 2011). Physiologisch ist das intrazelluläre Tauprotein mit den Mikrotubuli assoziiert und als Teil des Zytoskeletts für die Stabilität der Axone, den Transport von Zellsubstanzen innerhalb der Zelle und bei der Ausbildung von Dendriten von Bedeu-

tung (JELLINGER, 2001). Durch Hyperphosphorylierung lösen sich Tau-Proteine von den Mikrotubuli und werden in das Perikaryon und die Dendriten umgelagert (BRAAK et al., 1994). Dort lassen sie sich als diffuse punktförmige Strukturen anfärben (AUGUSTINACK et al., 2002). Dieses Stadium wurde bei Hunden mit regions- und zellspezifischer Verteilung in Neuronen und Gliazellen des Neokortex, Hippokampus und im entorhinalen Kortex beobachtet (WEGIEL et al., 1998; ROFINA et al., 2004; PUGLIESE et al., 2006; YU et al., 2011). Aber auch bei anderen Säugetieren, beispielsweise Kaninchen, Rhesusaffen, Pavianen, Guanakos und Brillenbären fanden sich tau-positive Aggregate (HÄRTIG et al., 2000). Im weiteren Verlauf aggregieren Tau-Proteine in Form von unlöslichen, paarweise umeinander gewundenen Filamenten. Auf Molekularebene weisen diese paarigen helikalen Filamente (PHF) eine charakteristische Doppel-Helix-Struktur auf (JELLINGER, 2001). PHFs können sich im Perikaryon zu neurofibrillären Bündeln (NFT) und in den distalen Zellfortsätzen zu Neuropilfäden formieren (BRAAK et al., 1986). Intrazelluläre NFTs wurden bisher nur bei wenigen alten Hunden (PAPAIOANNOU et al., 2001) beschrieben. Die Bildung von intrazellulären Tauaggregaten ist ein Prozess, der sich beim Menschen über mehrere Dekaden erstreckt (THAL & BRAAK, 2005), wobei Neurone mit NFTs bis zu 20 Jahre überleben können (MORSCH et al., 1999). Da NFTs auch über einen längeren Zeitraum nicht durch endogene zelluläre Beseitigungsmechanismen abgebaut werden können (MANDELKOW et al., 2007), führt deren Ansammlung letztlich zur Degeneration der Zelle (BRAAK et al., 1994). Im Parenchym verbleiben extrazelluläre NFTs in der Gestalt eines neuronalen Zellkörpers zurück. In diesem Stadium sind Zellkern und Zytoplasma nicht mehr detektierbar, zudem sind die Dendriten degeneriert und liegen als tau-positive Neuropilfäden vor (AUGUSTINACK et al., 2002). Ob auch Hunde dieses Stadium erreichen, wird debattiert (CUMMINGS et al., 1996a; NAKAYAMA et al., 2004; PAPAIOANNOU et al., 2001). Eine Hypothese besteht darin, dass der Großteil der Hundepopulation auf Grund des nicht parallelen Alterns von Körper und Gehirn keine NFTs ausbildet (NAKAYAMA et al., 2004), wie in Abb. 2.3 schematisch dargestellt ist.

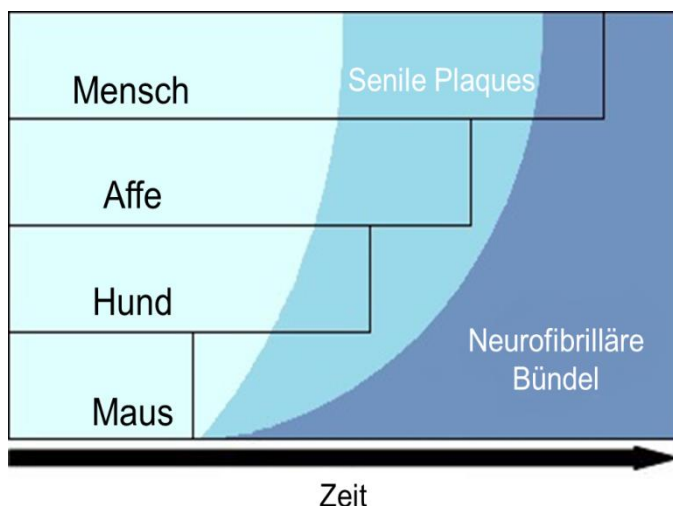


Abb. 2.3: Hypothese des ungleichen Alterns von Körper und Gehirn

Menschen, Hunde und Affen bilden altersassoziiert senile Plaques bestehend aus A β . Auf Grund der im Vergleich zum Menschen kürzeren Lebensspanne von Hunden und anderen Säugern werden keine NFTs in diesen Spezies formiert. Modifiziert nach NAKAYAMA et al., 2004.

Die räumlichen und zeitlichen Zusammenhänge einer Tau-Pathologie zu den A β -Ablagerungen sind noch nicht vollständig geklärt (PIMPLIKAR, 2009). Allerdings scheint die Zytotoxizität von A β und insbesondere die des pEA β durch abnormes Tauprotein getriggert zu werden (NUSSBAUM et al., 2012). Ob auch beim Hund ein solcher Zusammenhang besteht, wurde bisher nicht untersucht.

2.3 Mikroglia

Mikroglia gehören zur Zellgruppe der nicht-neuronalen Zellen und nehmen wichtige trophische und immunologische Funktionen im zentralen Nervensystem (ZNS) wahr. Die Erstbeschreibung der Zellgruppe erfolgte 1846 durch den Pathologen Rudolf Virchow, der auch den Begriff Neuroglia prägte (VIRCHOW, 1846). Wesentliche Merkmale der Mikroglia, die bis heute ihre Gültigkeit haben und im Folgenden beschrieben werden, postulierte 1932 der Mediziner und Histologe PÍO DEL RÍO-HORTEGA. Die moderne Ära der Forschung an Mikroglia startete in den 1960er-Jahren als Untersuchungen der mikroglialen Reaktion bei intakter Blut-Hirn-Schranke (BHS) möglich wurden (BLINZINGER & KREUTZBERG, 1968). Seither gab es zahlreiche Untersuchungen, insbesondere in postnatal von Mäusen und Ratten gewonnenen Zellkulturen (KETTENMANN et al., 2011), aber auch an Mikroglia, die ex vivo aus Hunden gewonnen wurden (STEIN et al., 2004, 2006).

2.3.1 Ursprung und Formen

Mikroglia stellen den wesentlichen Bestandteil des intrinsischen Immunsystems des Gehirns dar und machen 5 bis 10 % der Gesamtpopulation der Gliazellen aus (KREUTZBERG, 1996; LUO et al., 2010; VERKHRATSKY & BUTT, 2007). Als Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) wandern sie aus der Peripherie über das Blut in bestimmte Gebiete des ZNS ein, migrieren als amöboide Mikroglia in weitere Regionen des ZNS und differenzieren schließlich zu ramifizierten Mikroglia (BAUER et al., 1996). Besonders intensiv finden die Prozesse pränatal, bevor sich die BHS vollständig entwickelt hat, statt. Postnatal gelangen bei intakter BHS nur wenige Monozyten ins Gehirn (STREIT et al., 2004b).

Mikroglia existieren in jeder Region des adulten Gehirns, wobei ihr phänotypisches Erscheinungsbild und ihre Verteilung von der Lokalisation und dessen Zytoarchitektur abhängig sind (BAUER et al., 1996; LAWSON et al., 1990; LUO et al., 2010). In vivo zeigen die Zellen wenig Umsatz, weswegen vermutet wird, dass Mikroglia unter physiologischen Umständen eine relativ stabile Zellpopulation darstellen und mit dem Organismus altern (NORDEN & GODBOUT, 2013; STREIT, 2002).

Ein wesentliches Merkmal der Mikroglia sind die verschiedenen Stadien der Aktivierung, die mit morphologischen Charakteristika einhergehen. Im ramifizierten Stadium nehmen Mikroglia eine patrouillierende Aufgabe wahr, indem sie mit ihren extrem beweglichen Fortsätzen das umgebende Parenchym penetrieren (NIMMERJAHN et al., 2005; KETTENMANN et al., 2011) und mit Gefäßen interagieren (GROSSMANN et al., 2002). Auch stehen sie mit Axonen und dendritischen Dornfortsätzen in Interaktion (WAKE et al., 2009) und können über oberflächliche Rezeptoren die neuronale Aktivität wahrnehmen, sowie mit Astrozyten kommunizieren (POCOCK & KETTENMANN, 2007). Obwohl Mikroglia in diesem Stadium nur geringfügig Oberflächenmarker exprimieren, sind sie mittels spezieller Modifikationen ihrer Fortsätze zur Phagozytose befähigt (SIERRA et al., 2010). Ramifizierte Mikroglia reagieren selbst auf kleinste pathologische Veränderungen, die das ZNS direkt oder indirekt angreifen und verändern im Zuge einer Aktivierung binnen Minuten ihre Morphologie (GRAEBER, 2010; GROSSMANN et al., 2002; TAFTI et al., 1996). Zusätzlich erfolgt eine intensive Proliferation der Mikroglia als erste Reaktion bei Entzün-

dungen und Läsionen (KREUTZBERG, 1996) sowie zur Regeneration beschädigter Hirnareale (NEUMANN et al., 2009; KETTENMANN et al., 2011). Die Teilung der Mikroglia bildet die Hauptressource an Immunzellen im ZNS (Streit, 2006). Die schnelle und frühe Reaktion der Mikroglia geht Veränderungen anderer Zellen wie der der Astrozyten voraus (KREUTZBERG, 1996).

Im aktivierten Zustand retrahieren die feinen Verzweigungen und die Fortsätze werden in den Zellkörper resorbiert (KETTENMANN et al., 2011; LUO et al., 2010). In diesem Stadium entsprechen Mikroglia funktionell aktiven Makrophagen, die zum Läsionsort migrieren (DAVIS et al., 1994; GRAEBER, 2010; STEIN et al., 2006) und auf ihrer Oberfläche MHC Klasse I Antigen präsentieren. Desweiteren exprimieren aktivierte Mikroglia eine Vielzahl an proinflammatorisch wirkenden Zytokinen, wie die Interleukine (IL-) 1 (DU et al., 2000), IL-6 (PAPASSOTIROPOULOS et al., 1999) und IL-8 (EL KHOURY & LUSTER, 2008), sowie den Tumor-Nekrose-Faktor- α (DICKSON et al., 1993). Dabei stellt die Expression der Oberflächenmoleküle eine stereotype Reaktion auf einen Stimulus dar, während die spezifische mikrogliale Antwort durch das funktionelle Profil bestimmt wird (STEIN et al., 2006).

Als reaktive Mikroglia wird ein weiteres Stadium der Aktivierung bezeichnet. Die Morphologie des Zellkörpers ist in diesem Stadium nicht einheitlich, sodass sich die Zellen klein und kugelig, aber auch stabförmig und pleomorph oder amöboid-ähnlich darstellen können. Ein gemeinsames Merkmal ist das Fehlen der verzweigten Fortsätze. Funktionell entspricht auch dieser Zelltyp aktiven Makrophagen und weist eine erhöhte Expression des C3-Komplement-Rezeptors, MHC Klasse I und II, sowie eine phagozytische Aktivität auf (DAVIS et al., 1994; KREUTZBERG, 1996; NEUMANN et al., 2009).

Verbunden mit viralen Infektionen des Gehirns treten sogenannte mehrkernige Riesenzellen auf (DAVIS et al., 1994). Diese sind größer als die anderen Formen der Mikroglia und entstehen vermutlich durch Fusion von reaktiven Mikroglia.

2.3.2 Die Rolle der Mikroglia beim Morbus Alzheimer

Altersassoziiert kommt es, auch unter Abwesenheit einer Pathologie, zu einer progressiven, mikroglialen Aktivierung mit einer Expression des MHC II-

Proteinkomplexes (MCGEER et al., 1987, 1993; PERLMUTTER, 1994; TAFTI et al., 1996). Mikroglia reagieren im Gehirn auf Stimuli, wobei sich das Muster der Reaktion altersassoziiert verändert und eine unkontrollierte Aktivierung stattfindet (LUO et al., 2010). Der progressive Anstieg an MHC II-Molekülen reflektiert nach PERRY et al. (1993) eine zunehmende Gewebeerstörung einhergehend mit dem Alterungsprozess. Eine mögliche Erklärung für diese unkontrollierte Aktivierung könnte in der Seneszenz der Mikroglia liegen, deren Ursache die mit jeder Mitose stattfindende Verkürzung der Telomerenden ist (FLANARY & STREIT, 2003; STREIT et al., 2004a). Mikrogliale Seneszenz äußert sich in Veränderungen der immunotypischen Expression von Zytokinen, dem inflammatorischen Profil, der Granularität und der Morphologie, wobei die Komplexität der Fortsätze abnimmt (DICKSON et al., 1993; NEUMANN et al., 2009; SIERRA et al., 2007).

Auch im Zuge der Alzheimer-Krankheit erfolgt eine Aktivierung von Mikroglia, die mit morphologischen und funktionellen Veränderungen einhergeht. Da keine intensive Infiltration von Leukozyten in das Gehirnparenchym stattfindet (STREIT et al., 2004b), liegt beim Morbus Alzheimer keine Entzündung im eigentlichen Sinne vor (GRAEBER, 2010). Mit Voranschreiten der chronischen Krankheit besteht eine Vielzahl an Interaktionen zwischen Mikroglia, Neuronen und den vorhandenen Proteinaggregaten, wobei Mikroglia nicht wesentlich an der Synthese von A β beteiligt sein sollen (D'ANDREA et al., 2004). Dennoch konnte eine Steigerung des APP der Gliazellen im hohen Alter und bei der Alzheimer- Erkrankung beobachtet werden (BANATI & BEYREUTHER, 1995). Die Aktivierung der Mikroglia kann über Bestandteile der parenchymalen Plaques erfolgen, die neben fibrillären A β auch lysosomale Enzyme, zelluläre DNS und andere Faktoren aus lysierten Zellkörpern enthalten. Diffuse Plaques dagegen besitzen diese zusätzlichen Faktoren nicht und bestehen nur aus aggregierten A β -Peptiden. In vitro Studien zeigten, dass Mikroglia auch in der Lage sind A β zu binden und entsprechende Oberflächenmoleküle wie Scavenger-Rezeptoren der Klasse A und B besitzen, die präaggregiertes A β erkennen (EL KHOURY et al., 1996). Weitere Rezeptoren sind die Fc- und Komplementrezeptoren, die opsonisiertes A β binden; der Rezeptor für hochglykierte Proteine, dessen Kopplung an A β zur mikroglialen Aktivierung mit Ausschüttung von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen führt (DU YAN et al.,

1997) sowie der Formylpeptid-ähnliche-Rezeptor 1 (CUI et al., 2002). In-vitro-Studien legen nahe, dass die Modulation der Mikroglia-A β -Interaktion durch Astrozyten erfolgt (VON BERNHARDI & EUGENÍN, 2004). Über einen längeren Zeitraum führt die mikrogliale Aktivierung mit anhaltender Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zum Verlust der neuroprotektiven Eigenschaften und zur mikroglialen Dystrophie (DICKSON et al., 1993; STREIT et al., 2004a, 2004b). Dystrophische Mikroglia unterliegen einem strukturellen Verfall, der sich in Deramifizierung mit Verlust der feinen Verzweigungen, Verkürzung, abnormer Verdrillung und/oder Fragmentation der Fortsätze sowie Ausbildung von zytoplasmatischen Auftreibungen bis hin zur Zytorrhexis äußert (STREIT et al., 2004a, 2009). Abbildung 2.4 zeigt schematisch physiologische und pathologische Merkmale von Mikroglia.

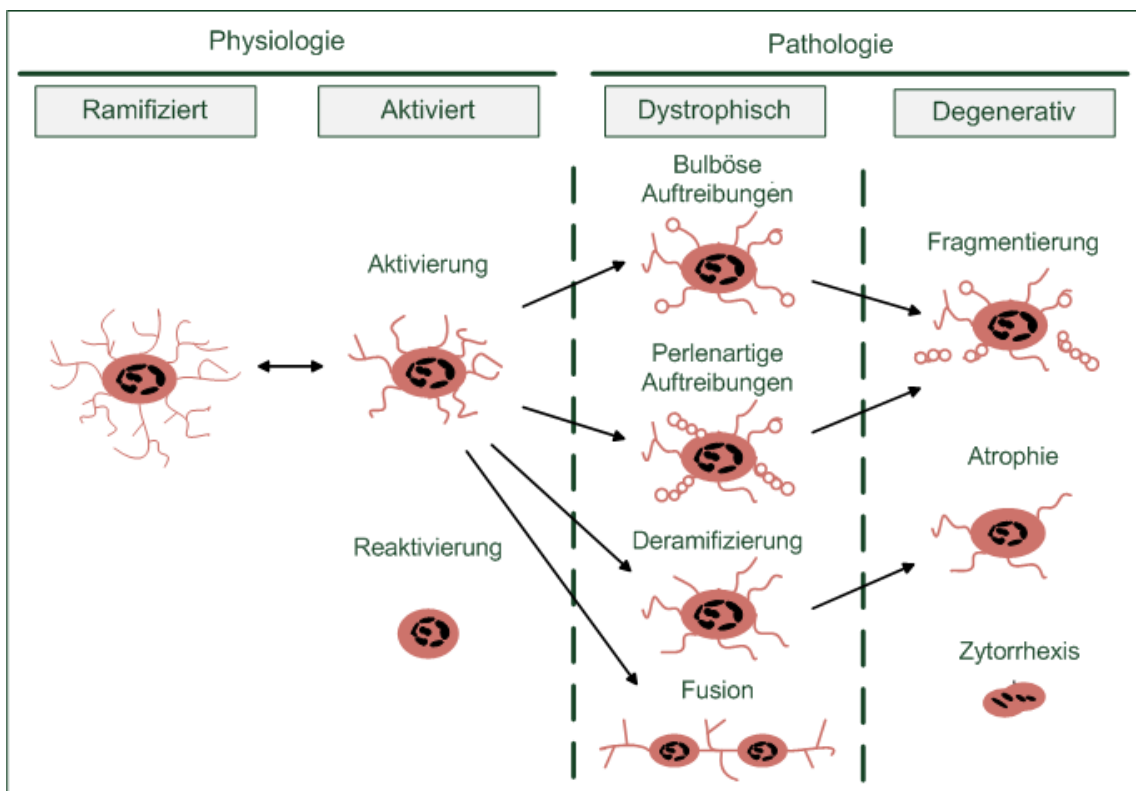


Abb. 2.4: Physiologie und Pathologie der Mikroglia

Die charakteristische Morphologie physiologischer und altersassoziierter pathologischer Mikroglia ermöglicht deren Differenzierung. Modifiziert nach STREIT (2006).

Die Anzahl an dystrophischen Mikroglia steigt bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer. Eine Folge der mikroglialen Dystrophie ist die Dysfunktion mit gestörter phagozytotischer Aktivität und beeinträchtiger

Beseitigung des A β sowie einer geminderten neuroprotektiven Funktion. Infolgedessen wird A β vermehrt aus Neuronen exprimiert und lagert sich im Parenchym ab (Abb. 2.5). Bei diesem Phänomen spricht man von frustrierter Phagozytose (ROGERS et al., 2002; STREIT, 2004b; EL KHOURY & LUSTER, 2008). Schließlich degenerieren die Zellen und setzen neurotoxische Substanzen frei, die zusätzlich das Gewebe schädigen (STREIT et al., 2009).

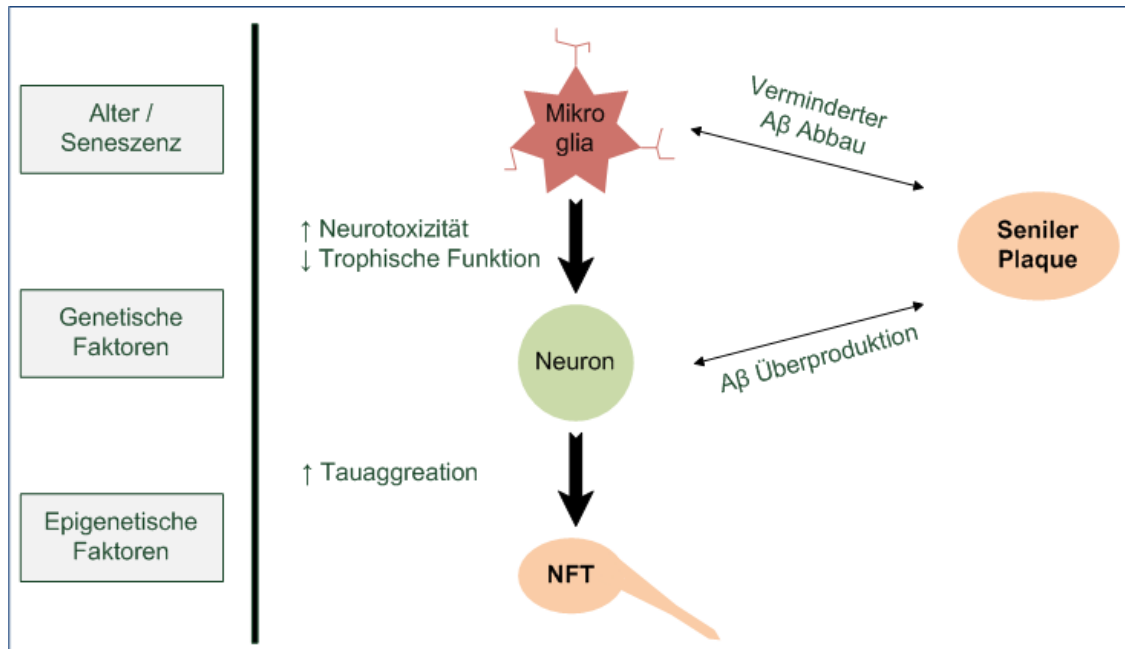


Abb. 2.5: Darstellung der mikroglialen Dysfunktionshypothese

Mit zunehmendem Alter unterliegen Mikroglia einer Seneszenz, wodurch sich ihr phagozytotischer Abbau von A β vermindert. Zudem verlieren Mikroglia ihre neuroprotektiven Eigenschaften und sezernieren neurotoxische Substanzen. Durch genetische Faktoren beeinflusst, exprimieren Neurone übermäßig A β -Peptide, die sich parenchymal in Form von senilen Plaques ablagern. Die Hyperphosphorylierung des Tauproteins mit Bildung von NFTs wird vermutlich durch epigenetische Faktoren im weiteren Verlauf der Erkrankung verursacht. Nach STREIT (2004).

Aufgrund ihrer mitotischen Aktivität befinden sich Mikroglia nicht im gleichen Alter. Zudem kann ihr funktioneller Status unterschiedlich sein, sodass auch morphologisch nicht veränderte, ramifizierte Mikroglia beim Morbus Alzheimer vorliegen können (LUO et al., 2010; STREIT et al., 2009). Andere Studien berichteten, dass selbst bei Patienten mit einer hochgradigen A β -Pathologie hauptsächlich residuale Mikroglia vorlagen und dystrophische Zellen bei vor-

handener Tau-Pathologie beobachtet wurden (STREIT et al., 2009) beziehungsweise dieser vorausgingen (LUO et al., 2010; NEUMANN et al., 2009). Eine Seneszenz der Mikroglia wurde im Gehirn von alten Menschen beobachtet (STREIT, 2006), tritt jedoch nicht bei transgenen Mausmodellen für die Alzheimer-Krankheit auf (STREIT, 2004). Dementsprechend sind Studien zur mikroglialen Dystrophie in Assoziation mit der Alzheimer-Pathologie in diesen Tiermodellen nicht möglich. Die Untersuchung der mikroglialen Morphologie in den Gehirnen von alten Hunden als natürliche Modelltiere des Morbus Alzheimer könnte helfen, diese Lücke zu schließen und die Grundlage für ein zukünftig besseres Verständnis der mikroglialen Reaktion und Degeneration im Gehirn gealterter Individuen schaffen.

2.4 Assoziation des CCDS zum Morbus Alzheimer

CCDS ähnelt in vielen Aspekten der Alzheimer-Krankheit des Menschen (HEAD, 2001). Diese wurde erstmals 1906 durch den Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer anhand der Symptome und neurodegenerativen Veränderungen seiner Patientin Auguste D. beschrieben (ALZHEIMER, 1907). Die Zeitspanne von den ersten Veränderungen am Gehirn bis hin zur klinischen Manifestation ist beim Menschen sehr variabel und reicht von 20 bis 50 Jahren (BRAAK et al., 2011; HOLTZMAN et al., 2011; JELLINGER, 2001). Das klinische Bild des Morbus Alzheimer repräsentiert das Endstadium eines pathologischen Prozesses, der durch parenchymale A β -Ablagerungen und intrazelluläre Tauaggregate ausgelöst wird (THAL & BRAAK, 2005). Das Verteilungsmuster der A β -Plaques im Gehirn erkrankter Menschen ähnelt dem progressiven Verlauf der Pathohistologie des CCDS (BRAAK & BRAAK, 1991; THAL & BRAAK, 2005). Zudem stimmt die Aminosäuresequenz des caninen und humanen APP zu 97 % überein (SARASA et al., 2010). Die Sequenz des caninen A β ist sogar identisch mit der des humanen Proteins (JOHNSTONE et al., 1991; SELKOE et al., 1987).

Diffuse Plaques stellen, wie auch beim Hund beschrieben, die früheste Form von A β -Ablagerungen bei der Alzheimer-Krankheit dar (DELAÈRE et al., 1991), wohingegen primitive, klassische und neuritische Plaques charakteristisch für fortgeschrittene Stadien sind (MIYAWAKI et al., 2001).

Literaturübersicht

Aufgrund dieser Übereinstimmungen in der Pathologie werden Hunde als natürliches Modelltier eines frühen Alzheimerstadiums betrachtet (HEAD, 2011), obwohl noch nicht alle Aspekte des CCDS untersucht wurden.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Hunde

Insgesamt wurden für diese Untersuchungen 24 Hunde im Alter von 2 bis 19 Jahren verwendet. Fünf dieser Tiere (Fälle 1 - 5), welche als Kontrollgruppe (Ko) dienten, wurden zu wissenschaftlichen Zwecken in der Universitätsklinik für Haus- und Heimtiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Utrecht, Königreich der Niederlande, gehalten. Nach der Euthanasie der Hunde mit Pentobarbital in Utrecht wurden deren Gehirne für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt. Die vorgenommenen Behandlungen an diesen Tieren entsprachen den Vorgaben des verantwortlichen ethischen Komitees der Universität Utrecht (Versuchsnummer: DEC 2011.III.08.091) und beeinflussten die Morphologie des Gehirns nicht. Die alten Hunde (Fälle 6 - 24) wurden aus klinisch relevanten Gründen euthanasiert und dem Veterinär-Anatomischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig zur Verfügung gestellt. Diese Tiere wurden entsprechend ihrer Größe und ihres Gewichts in drei Kategorien eingeteilt. Kategorie S bestand aus kleinen Tieren mit einem Körpergewicht unter 10 kg (Fälle 6, 13, 16, 17, 20, 21 und 24). Kategorie M umfasste Tiere mit einem Körpergewicht von 10 bis 25 kg (Fälle 8, 14, 15, 18, 22, 23) und Kategorie L enthielt Hunde mit einem Körpergewicht über 25 kg (Fälle 7, 9, 10, 11, 12 und 19). Eine tabellarische Übersicht des Tiermaterials mit Daten zur Rasse, Alter, Geschlecht, Symptomatik und der Gruppeneinteilung enthält Tabelle 9.1 im Anhang. Die Gehirne aller Hunde wurden histologisch und mit immunhistologischen Methoden auf Ablagerungen von pE3A β und A β ₈₋₁₇ untersucht. Zusätzlich erfolgte die Analyse bestimmter Hirnabschnitte und -areale auf mögliche Tau-Pathologien. Eine Quantifizierung der Amyloid- und Tauablagerungen sowie der Anzahl an Mikroglia wurde an allen Tieren vorgenommen. Zur Darstellung der Morphologie der Mikroglia wurden die Gehirne von sechs Hunden mit unterschiedlich starker Neuropathologie (Fälle 8, 11, 16, 18, 20 und 23) und zwei Tieren der Kontrollgruppe (Fälle 2 und 5) ausgewählt, die in Tab. 9.1 (Anhang) durch Fettdruck hervorgehoben sind.

3.2 Gehirnproben

3.2.1 Gewinnung und Kryofixierung der Gehirne

Bei allen Hunden wurde innerhalb von ein bis drei Stunden post mortem (p.m.) das Gehirn aus dem Schädel entnommen und in 4%iges, gepuffertes Paraformaldehyd (PFA) für 5 Tage bei 4 °C inkubiert. Nach der Fixation wurden die Gehirne lamelliert und Proben aus dem Lobus frontalis auf Höhe des Sulcus cruciatus, teilweise mit Nucleus caudatus, Putamen und medialem Septum entnommen. Weitere Proben stammten aus dem Lobus temporalis mit der Hippokampusformation. Diese Gehirnscheiben wurden in 30%iger Saccharose in 0,1 M Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) für drei bis fünf Tage vitrifiziert und anschließend mittels Methylbutan auf -80 °C schockgefroren. In Vorbereitung auf das Schneiden wurden die gefrorenen Gehirnscheiben für 4 bis 24 Stunden bei -20 °C gelagert und anschließend mit einem Kryostat-Mikrotom (Leica CM3050 S) 10 µm Schnitte für die Übersichtsfärbung und 40 µm Schnitte für die Stereologie angefertigt. Die Lagerung der Schnitte erfolgte in PBS mit 0,1%igem Natriumazid bei 4 °C.

3.2.2 Makroskopische Untersuchung der Gehirne

Die makroskopische Untersuchung der Gehirne erfolgte nach Entnahme aus dem Schädel und nach Fixierung in 4%igem gepufferten PFA. Die Gehirne von Hunden, welche älter als 7 Jahre waren, wurden mit denen von 2 Jahre alten Beagles verglichen. Dabei wurde die Weite der Sulci, Ausprägung und Prominenz der Gyri und das Vorliegen von Vasopathien der Meningen analysiert. Zusätzlich erfolgte die Messung der grauen Substanz an Gewebescheiben des frontalen Kortex zur Ermittlung einer kortikalen Atrophie analog ROFINA et al. (2006). Dafür wurden an fünf Stellen des frontalen Kortex, inklusive Gyrus ectomarginalis rostralis, Gyrus postcruciatus und Gyrus marginalis, die Breite der grauen Substanz und die Gesamtbreite des Lobus frontalis einer Hemisphäre vermessen. Aus den fünf Einzelmessungen wurde ein Mittelwert gebildet, der durch die Gesamtbreite des Lobus frontalis dividiert wurde.

3.2.3 Untersuchte Gehirnregionen

Die Hirnregionen wurden nach STOFFEL (2011) und ADRIANOV & MERING (2010) definiert. Es wurden Kryoschnitte des frontalen Kortex mit dem Gyrus ectomarginalis rostralis, Gyrus postcruciatus und Gyrus marginalis und der Hippokampusformation mit dem Gyrus dentatus, Cornu ammonis und Subiculum angefertigt. Zusätzlich wurde der entorhinale Kortex des Gyrus parahippocampalis auf Höhe des Sulcus collateralis untersucht (Abb. 3.1).

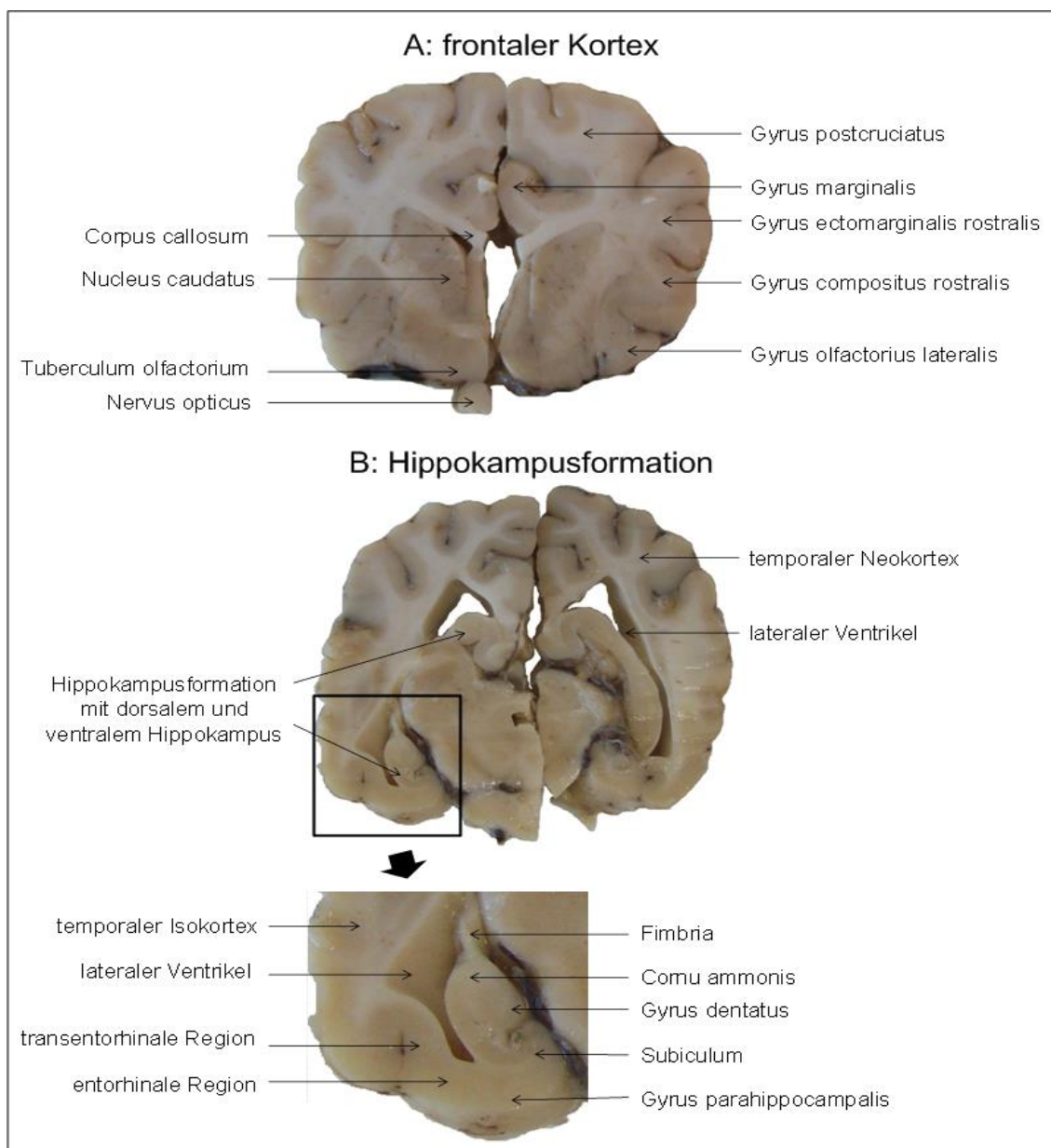


Abb. 3.1: Darstellung der untersuchten Gehirnregionen

A) Schnittebene des frontalen Kortex am Gehirnschnitt eines 18 Jahre alten Hundes (Fall 23). B) Schnittebene auf Höhe der Hippokampusformation eines 19 Jahre alten Hundes mit makroskopischer Betrachtung des ventralen Hippokampus (Fall 24).

Mit einer Hämatoxylin und Eosin (H&E) -Übersichtsfärbung wurden von den 24 Hunden (Fälle 1 - 24) jeweils 2 Kryoschnitte des frontalen Kortex, Hippokampus und des entorhinalen Kortex ausgewertet.

Analysen über das Vorliegen von A β - und Tau-Ablagerungen mittels Kongorotfärbung und Immunhistochemie erfolgten im frontalen Kortex der Gehirne aller 24 Hunde mit einem Alter von 2 bis 19 Jahren (Fälle 1 - 24, Tab. 9.1 im Anhang). Der ventrale Hippokampus von 23 Hunden (Fälle 1 - 21 und 23 - 24) wurde zur Detektion und Quantifizierung einer Proteinpathologie ausgewertet. Die Untersuchungen erfolgten in der Molekularschicht sowie der Körnerzellschicht der Fascia dentata und den Hippokampusregionen CA4 bis CA1. In 6 Fällen konnte zusätzlich der dorsale Hippokampus ausgewertet werden (Fälle 15 - 19 und 24). Der entorhinale Kortex der Fälle 1 - 14, 16, 17, 19, 20 und 22 bis 24 wurde auf A β -Ablagerungen untersucht. Kryoschnitte des frontalen Kortex aller Hunde (Fälle 1 - 24) erfassten auch Teile der Leptomeninx zur Detektion von gefäßassoziierten A β .

Die Darstellung der Mikroglia erfolgte mittels Immunhistochemie an jeweils 5 Kryoschnitten des Neo- und Archikortex. Von allen Tieren (Fälle 1 - 24) lag der frontale Kortex und der ventrale Hippokampus zur Untersuchung der Mikroglia vor. Ihre Anzahl wurde in der grauen Substanz des Gyrus postcruciatum, im Gyrus dentatus und Cornu ammonis ermittelt. Zusätzlich konnten Mikroglia des dorsalen Hippokampus von sechs Hunden auf altersassoziierte Veränderungen beurteilt werden (Fälle 15 - 19 und 24). Bei drei Hunden (Fälle 15, 18 und 21) konnte der entorhinale Kortex nicht untersucht werden.

Kryoschnitte der frontalen und entorhinalen Kortices sowie der Hippokampi von acht ausgewählten Tieren (Fälle 2, 5, 8, 11, 16, 18, 20 und 23) unterlagen weiteren Studien zur Morphologie der Mikroglia und zum Nachweis HLA DR-positiver Zellen.

3.2.4 Histologische Färbungen

Eine H&E-Übersichtsfärbung wurde von Schnitten des frontalen Kortex und des Hippokampus inklusive des entorhinalen Kortex angefertigt (Protokoll s. Anhang 9.2). Zusätzlich erfolgte in den genannten Arealen der Nachweis von kongophillem A β mittels der Kongorot-Färbung nach WILCOCK et al. (2006).

Protokoll der Kongorot-Färbung nach WILCOCK

1. Waschen der Schnitte in 1 x PBS 15 Minuten
2. Aufziehen der Schnitte auf Superfrost® Plus Objektträger
3. Überschüssiges PBS abtropfen lassen und Schnitte bei Raumtemperatur lufttrocknen über Nacht
4. Rehydratation der Schnitte in Aqua dest. 30 Sekunden
5. Inkubation der Schnitte in alkalischer Lösung bestehend aus 80 % Ethanol, gesättigt mit Natriumchlorid unter Zugabe von 1 % 1 M NaOH 20 Minuten
6. Inkubation der Schnitte in gefilterter Kongorot-Lösung, 1 % 1 M NaOH enthaltend 30 Minuten
7. Entwässern der Schnitte durch achtmaliges Eintauchen in 95 % Ethanol und anschließend achtmaliges Eintauchen in 100 % Ethanol
8. Inkubation in Toluol 2 - 3 Minuten
9. Eindecken mit Entellan (in Toluol)
10. Lufttrocknen der Schnitte bei Raumtemperatur über Nacht

3.3 Immunohistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen

Die Anwendung von Immunfluoreszenzmarkierungen diene dem Nachweis des Gesamt-A β (A β ₈₋₁₇), des modifizierten pE3A β , des hyperphosphorylierten Tau-proteins, des Histo-Kompatibilitäts-Antigens der Klasse II (MHC II), sowie des ionisierten Calcium-bindenden Adaptermoleküls 1 (Iba1) der Makrophagen und Mikroglia.

3.3.1 Antikörper und Seren

Die Primärantikörper wurden in Blockerlösung aus PBS mit 0,05 % Tween[®] 20 (PBS-T), 2 % Rinderserumalbumin, 0,3 % Milchpulver und 0,5 % Esel-Normalserum verdünnt. Für die Sekundärantikörper und das Peroxidasegekoppelte Extravidin wurden unterschiedliche Konzentrationen von PBS-T und der Blockerlösung verwendet.

Blockerserum

Zur Gewährleistung von einheitlichen und vergleichbaren Färbungen wurde ausschließlich Esel-Normalserum als Blockerserum verwendet.

Primäre Antikörper

Die kommerziell erhältlichen Primärantikörper sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Es sind monoklonale Antikörper des Isotyps IgG1, mit Ausnahme des polyklonalen Iba1-Antikörpers.

Sekundäre Antikörper

Für immunhistochemische Färbungen wurden bei Verwendung monoklonaler Primärantikörper aus der Maus, biotinylierte Esel-anti-Maus Sekundärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper gegen Iba1 wurden biotinylierte Esel-anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt. Die Verdünnung dieser Antikörper betrug jeweils 1:1000 in gleichen Teilen Blockerlösung und PBS-T.

Zur Visualisierung der Immunfluoreszenzfärbung von Iba1 wurde ein polyklonaler Esel-anti-Kaninchen Cyanin 3 (Cy3) -konjugierter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Dieser wies eine maximale Anregung bei 550 nm und eine maximale Emission von 570 nm auf.

Als Sekundärantikörper zur Visualisierung von Iba1-markierter Mikroglia bei der Doppelmarkierung von Mikroglia und Tauprotein diente ein polyklonaler Esel-anti-Kaninchen Cy3-konjugierter Antikörper in einer Verdünnung von 1:500. Tau, das mit AT8 detektiert wurde, konnte mit dem 1:300 verdünnten polyklona-

Material und Methoden

len Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 488 Esel-anti-Maus IgG dargestellt werden. In Tabelle 9.4 im Anhang sind Informationen zu den verwendeten Sekundärantikörpern zusammengefasst.

Tab. 3.1: Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern

Antikörper	Spezifität	Firma	Spezies	Verdünnung ABC- Methode	Ref.
A β ₈₋₁₇ (Klon 6F3D)	Aminosäure- sequenz 8 - 17 von A β	Dakocytomation	Maus	1:200	Czasch et al., 2006
pE3A β (Klon 2 - 48)	Pyroglutamat an Position 3 des A β	Synaptic Systems	Maus	1:500	HARTLAGE- RÜBSAMEN et al., 2011
AT8	Phosphorylier- tes Serin 202 und Threonin 205 von hu- manem Tau	Thermo Scientific	Maus	1:1000	GOEDERT et al., 1995
Iba1*	Ionisiertes Calcium- bindendes Adapter- molekül 1	Wako	Kanin- chen	1:1000	IMAI et al., 1996
TAL.1B5	α -Kette des humanen HLA- Klasse II DR Antigens	Dakocytomation	Maus	1:200	TAFTI et al., 1996
* Dieser Antikörper wurde auch für die Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:200 verwendet					

Tertiärer Antikörper

Peroxidase-gekoppeltes Extravidin diente als tertiärer Antikörper der immunhistochemischen Färbemethoden. Die Verdünnung betrug 1:2000 in einem Teil Blockerlösung und zwei Teilen PBS-T.

3.3.2 Protokoll der ABC-Methode

Die indirekte Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode nach HSU et al. (1981) und modifiziert für den Hund nach ALLDINGER et al. (1996) erwies sich als sehr spezifische und sensible Färbung. Im folgenden Protokoll wurden freischwebende Kryoschnitte verwendet. Als Chromogen diente 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), gelöst in 0,05 M Tris-Borat-EDTA-Puffer (Substratpuffer, pH 8) und versetzt mit Nickelammoniumsulfat (Ni). Die entstandene DABNi-Lösung wurde für 2 Stunden auf dem Rüttler von Heidolph (Duomax 1013) geschüttelt.

- | | |
|---|----------------|
| 1. Waschen der Schnitte in PBS | 2 x 10 Minuten |
| 2. Beseitigung endogener Peroxidase-Aktivität
mittels 60%igen Methanols versetzt mit
2 % Wasserstoffperoxid | 30 Minuten |
| 3. Waschen in PBS-T | 3 x 10 Minuten |
| 4. Blocken unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen
mit Blockerlösung | 1 Stunde |
| 5. Inkubation der Schnitte im gelösten Primärantikörper
auf dem Plattformschüttler bei Raumtemperatur | ca. 18 Stunden |
| 6. Waschen der Schnitte mit PBS-T | 3 x 10 Minuten |
| 7. Inkubation im biotinylierten Sekundärantikörper | 1 Stunde |
| 8. Waschen mit PBS-T | 3 x 10 Minuten |
| 9. Inkubation im Peroxidase-gekoppelten Extravidin | 1 Stunde |

Material und Methoden

- | | |
|--|----------------|
| 10. Waschen in PBS-T | 2 x 10 Minuten |
| 11. Waschen mit Substratpuffer | 10 Minuten |
| 12. Vorinkubation in DABNi-Lösung (in 10 ml Substratpuffer sind 2 mg DAB und 40 mg Ni gelöst) | 5 Minuten |
| 13. Visualisierungsreaktion mit 0,5 µl 30%igem H ₂ O ₂ pro ml DABNi-Lösung | 5 - 10 Minuten |
| 14. Waschen mit PBS-T | 3 x 10 Minuten |
| 15. Waschen mit Aqua dest. | 1 Minute |
| 16. Aufziehen der Schnitte auf Menzel-Objektträger | |
| 17. Lufttrocknen der Schnitte bei Raumtemperatur | über Nacht |
| 18. Eindecken mit Entellan in Toluol | |

Zur Färbung des Gesamt-A β (A β_{8-17}) erfolgte nach dem ersten Waschen eine zusätzliche Säurebehandlung der Schnitte nach KITAMOTO et al. (1987) und VINTERS et al. (1988). Die Säure gewährleistet die Freisetzung von N- und C-terminalen Epitopen des A β und erhöht somit dessen Immunreaktivität. Zur Vorbereitung wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten im destillierten Wasser gewaschen und anschließend für 10 Minuten in 98%ige Ameisensäure überführt. Im Anschluss daran folgten drei Waschschritte mit PBS-T für 1 - 2 Minuten unter Kontrolle des pH-Wertes mittels Indikatorpapier. Die Schnitte wurden weitere dreimal in PBS-T für jeweils 10 Minuten gewaschen. Entsprechend der Schritte 2 bis 18 wurde weiter verfahren.

3.3.3 Protokoll zur Immunfluoreszenz

Nach folgendem Protokoll wurden die Fluoreszenzfärbungen von frei schwebenden Kryoschnitten zur Detektion von Mikroglia beziehungsweise Makrophagen mittels des polyklonalen Kaninchen-anti-Iba1 Antikörpers vorgenommen. Als Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper kam Cy3 AffiniPure Esel-anti-Kaninchen IgG (1:500) zum Einsatz.

Material und Methoden

Das Protokoll wurde auch bei der Doppelmarkierung von Mikroglia und hyperphosphoryliertem Tauprotein an frei schwebenden Kryoschnitten angewandt. Diese Färbung diente der Bewertung der morphologischen Veränderungen von Mikroglia in Assoziation zu einer Tau-Pathologie. Als Primärantikörper wurden Iba1 und AT8 verwendet. Die Visualisierung erfolgte mittels der Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper Cy3 AffiniPure Esel-anti-Kaninchen IgG (1:500) und Alexa Fluor® 488 AffiniPure Esel-anti-Maus IgG (1:300).

Das Quenchen der Autofluoreszenz mittels Sudanschwarz B erfolgte nach dem Protokoll von SCHNELL et al. (1999), wobei Sudanschwarz an lipophile und hydrophobe Elemente wie z.B. Lipofuszin bindet.

1. Waschen der Schnitte in PBS 2 x 10 Minuten
2. Beseitigung endogener Peroxidase-Aktivität
mittels 60%igen Methanols versetzt mit
2 % Wasserstoffperoxid 30 Minuten
3. Waschen in PBS-T 3 x 10 Minuten
4. Blocken unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen
mit Blockerlösung 1 Stunde
5. Inkubation der Schnitte im gelösten
Primärantikörper auf dem Plattformschüttler
bei Raumtemperatur ca. 18 Stunden
6. Waschen der Schnitte mit PBS-T 3 x 10 Minuten
7. Inkubation im Sekundärantikörper 1 Stunde
8. Waschen mit PBS-T 2 x 10 Minuten
9. 2 x Spülen in Aqua dest. 1. Spülen: 5 Minuten
2. Spülen: 2 Minuten
10. Inkubation in 70%igem Ethanol 2 Minuten
11. Inkubation der Schnitte in 1%iger Sudanschwarz-B-
Lösung (gelöst in 70%igem Alkohol) 10 Minuten

Material und Methoden

12. Überführen der Schnitte in 70%igen Ethanol	2 Minuten
13. Überführen der Schnitte in 7%igen Ethanol	5 Minuten
14. Spülen in Aqua dest.	2 Minuten
15. Waschen mit PBS-T	2 x 10 Minuten
16. Aufziehen der Schnitte auf Objektträger	
17. Lufttrocknen der Schnitte bei Raumtemperatur	über Nacht
18. Eindecken mit erwärmter Glyceringelatine	

3.3.4 Kontrollen

Bei jeder Färbung wurden Kontrollen ohne Primärantikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle, insbesondere für die A β - und Taufärbung, wurde menschliches Gewebe des Brodmann-Areals 7 eines Patienten mit Alzheimer (Braak-Stadium VI analog BRAAK & BRAAK, 1991) verwendet. Das humane Gewebe wurde von Prof. Dr. Thomas Arendt vom Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt.

3.4 Auswertung der Färbungen

3.4.1 Deskriptive Analyse der Präparate

Die H&E-gefärbten Gehirnschnitte wurden histologisch auf das Vorhandensein von Fibrosen der Meningen, Lipofuszinablagerungen in Neuronen und perivaskuläre Makrophagen in der grauen und weißen Substanz sowie im Hinblick auf das Vorkommen von Sphäroiden und eosinophilen Kügelchen in der weißen Substanz ausgewertet. Die erhobenen Befunde wurden semiquantitativ beurteilt (keine, geringgradige, mittelgradige und hochgradige Veränderungen). Das Vorhandensein von Mikroblutungen in der grauen Substanz wurde mit einer Ja-/Nein-Aussage bewertet. Die Auswahl und Analyse der histologischen Merkmale erfolgte in Anlehnung an BORRÀS et al (1999) und CZASCH (2001).

Gemäß der Verteilung von A β -Plaques innerhalb der Schichten des frontalen Kortex wurden die Tiere in 4 Stadien nach SATOU et al. (1997) eingeteilt.

Die A β -PlaquerVerteilung und deren Morphologie wurden zwischen den zwei Antikörpern gegen A β_{8-17} und pE3A β verglichen. Der Befall von Gefäßen mit A β_{8-17} beziehungsweise pE3A β und die Ausbildung einer CAA wurden zusätzlich beurteilt. Die Klassifizierung des Grades an CAA erfolgte nach THAL et al. (2002a). Kleine A β -Ablagerungen, die nahe den glatten Muskelzellen der Tunica media in den Gefäßen einer Gehirnregion lokalisiert waren, stellten milde Fälle dar. Bei schweren Fällen waren die A β -Ablagerungen in der Tunica media großflächiger und fanden sich zudem in zahlreichen Gefäßen mehrerer Gehirnregionen.

Tau-Pathologien wurden hinsichtlich ihrer Verbreitung, der Formation von neurofibrillären Bündeln (NFT), Neuropilfäden und neuritischen Plaques sowie einer assoziierten Amyloid-Pathologie untersucht. Die Morphologie dieser tau-positiven Strukturen wurde in Anlehnung an menschliches Material (Braak VI) evaluiert. Die erhobenen Befunde wurden semiquantitativ ausgewertet, wobei die Einteilung gemäß keiner, geringgradiger, mittelgradiger und hochgradiger Veränderungen erfolgte.

Die Charakterisierung der Mikroglia erfolgte mit Hinblick auf die parenchymale Verteilung, die Morphologie und einer assoziierten Amyloid- und Tau-Pathologie. Zusätzlich wurde eine Untersuchung der Mikroglia in immunfluoreszenten Schnitten vorgenommen. Hierfür wurden zunächst Bilderstapel am Laser-Scanning-Mikroskop 510 Meta angefertigt und diese mit dem Filament Tracer der Software Imaris 7.2.3 in dreidimensionale Objekte umgewandelt. Zur Definition der Zellen anhand entsprechender Grenzwerte zur Helligkeit und Größe wurde ein objektbasiertes Protokoll für Imaris etabliert. Die Bereiche unterhalb dieser Parameter wurden eliminiert und unspezifische Markierungen aus den Berechnungen ausgeschlossen. Die dabei verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Folgende Eigenschaften der Mikroglia des Gyrus postcruciatum und des Cornu ammonis wurden bewertet:

- das mittlere Areal, welches die Mikroglia einnahmen,
- die mittlere Länge der Zellausläufer,

- der mittlere Durchmesser der Zellausläufer und
- die durchschnittliche Anzahl an Verzweigungspunkten der Zellausläufer.

Die Erhebung der Daten erfolgte an Kryoschnitten zweier junger und sechs alter Hunde. Die Tiere sind in Tabelle 9.1 im Anhang durch Fettdruck hervorgehoben. Die Gruppe der alten Hunde umfasste drei Tiere mit einer geringgradigen A β -Pathologie (Satou-Stadium 1), aber mittel- bis hochgradigen Tauablagerungen (Fälle 11, 16, 18). Desweiteren wurden die Mikroglia von Hunden mit hochgradigen A β -Ablagerungen (Fälle 8, 20) und CAA (Fall 23) untersucht.

Tab. 3.2: Einstellungen der Parameter des Filament Tracer im Programm Imaris

Parameter	Einstellungen
Channel	1 (rot)
Filter	Median Filter 3 x 3 x 3
Dendrite Starting Point Diameter	10 μ m
Dendrite Seed Points Diameter	1 μ m
Dendrite Starting Point Treshold Low	Manuell
Dendrite Starting Point Treshold High	Manuell
Dendrite Seed Points Treshold	Maximum
Diameter of Sphere Region(s)	20 μ m
Dendrite Diameter Treshold	2 μ m

3.4.2 Quantitative Analyse der immunhistochemischen Befunde

Eine quantitative Analyse wurde mit dem Optical Fractionator der Stereo Investigator Software 8 durchgeführt. Diese Methode erlaubt eine objektive und effektive Analyse von biologischen Strukturen durch ein systematisches wissenschaftliches Stichprobenverfahren.

Jede Tiergruppe umfasste nach den Richtlinien von KEUKER et al. (2001) mindestens 5 Tiere (siehe Tab. 9.1 im Anhang). Pro Tier wurden 5 Schnitte des Gyrus postcruciatius im frontalen Kortex, des Hippokampus im Bereich des Gyrus dentatus und des Cornu ammonis sowie des entorhinalen Kortex im Bereich der Fissura collateralis bewertet. Der Abstand der Schnitte betrug 400 μ m. Der Gundersen Koeffizient lag stets unter 10 % zur Gewährleistung einer

unverzerrten Datenerhebung. Anschließend wurde die Anzahl an A β_{8-17} - beziehungsweise pE3A β -enthaltenden parenchymalen und gefäßassoziierten Ablagerungen verglichen. Weiterhin wurde die Anzahl der Mikroglia mit einem Zeiss Axio Imager.D1-Mikroskop ausgewertet. Die Objektive und Parameter zur Rastergröße und Zählrahmen für die einzelnen Zielstrukturen in den Gehirnregionen sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Alle Untersuchungen und Analysen wurden verblindet gegenüber dem Alter der Hunde, ihrer Größe und Gruppenzugehörigkeit durchgeführt.

Tab. 3.3: Übersicht zu den Parametern der Stereologie

Zielstruktur	Region	Objektiv	Rastergröße (in μm)	Zählrahmen (in μm)
Amyloid	fK, Hk, eK	10x	350 x 350	250 x 250
Tau	Hk	20x	500 x 500	350 x 350
Mikroglia	fK	20x	2100 x 1300	100 x 100
	Hk: Gyrus dentatus	20x	350 x 350	100 x 100
	Hk: Cornu ammonis	20x	350 x 350	100 x 100
	eK	20x	350 x 350	100 x 100
Legende: fK = frontaler Kortex, Hk = Hippokampus, eK = entorhinaler Kortex				

3.4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung von Sigma Plot 12.0. Potentielle statistische Unterschiede zwischen den Lebenserwartungen von kleinen, mittelgroßen und großen Hunden wurden mittels einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht.

Unterschiede im Ausmaß der Substantia grisea des Lobus frontalis zwischen jungen und alten Hunden ab 8 Jahren wurden mittels t-Test analysiert. Innerhalb der Kategorien der alten Hunde erfolgte die statistische Evaluierung mit einer einfachen ANOVA.

Das Vorhandensein von Lipofuszinablagerungen in Neuronen und perivaskulären Zellen der alten Hunde wurde unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests gegenüber der Kontrollgruppe untersucht. Der gleiche Test fand Verwendung

bei der statistischen Auswertung des Vorhandenseins von Mikroblutungen in den untersuchten Gehirnregionen.

Mit den stereologisch erhobenen Ergebnissen für parenchymale und gefäßassoziierte A β -Ablagerungen wurden Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe und alten Hunden mittels eines t-Tests durchgeführt. Innerhalb der Kategorien der alten Hunde wurde eine einfache ANOVA, gefolgt von einem Holm-Sidak-Test durchgeführt, um statistisch relevante Abweichungen festzustellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass von einer Normalverteilung der altersassoziierten A β -Ablagerungen ausgegangen werden kann. Aus diesem Grund wurde der Holm-Sidak-Test auch in drei Fällen angewandt, bei denen der Normalitätstest nicht bestanden wurde.

Unterschiede in der Menge von A β_{8-17} und pE3A β wurden basierend auf dem Alter der Tiere und der Größen- und Gewichtskategorien mit der Pearsonschen Produkt-Moment-Korrelation bewertet. Analog dazu erfolgte die Korrelation des A β zu den untersuchten Gehirnregionen.

Die Evaluierung der erhobenen Daten zur Anzahl der Mikroglia in den untersuchten Gehirnregionen erfolgte mit Hinblick auf das Alter der Tiere. Hierfür fand ein Vergleich der Zellzahl zwischen der Kontrollgruppe und den alten Hunden mit einem t-Test statt. Eine einfache ANOVA fand Anwendung bei der Evaluierung der Anzahl an Mikroglia in Assoziation zu den Größen- und Gewichtskategorien und dem Schweregrad der Proteinpathologie. Im Falle von positiven Ergebnissen wurde ein Holm-Sidak-Test angeschlossen. Die Bewertung der Daten des Filament Tracer erfolgten mit einer einfachen ANOVA zwischen der Kontrollgruppe und Hunden mit Tau- und A β -Pathologie.

P-Werte kleiner als 0,05 galten als statistisch signifikant und wurden mit einem Sternchen versehen. P-Werte niedriger als 0,01 galten als statistisch hoch signifikant und wurden mit zwei Sternchen gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Anamnestische Merkmale der Hunde

4.1.1 Gruppeneinteilung in Größen- und Gewichtskategorien

Die Gehirne von 24 Hunden wurden für die vorliegende Arbeit morphologisch untersucht. Fünf Beagle (Labortiere) wurden zu einer Kontrollgruppe (Ko) zusammengefasst. Die alten Hunde wurden nach ihrem Körpergewicht in drei Kategorien unterteilt, welche kleine (S, < 10 kg), mittelgroße (M, 10 - 25 kg) und große (L, > 25 kg) Hunde umfassen. In Tabelle 2.1 sind Rasse, Alter, Geschlecht, eine bekannte Symptomatik und die Zugehörigkeit der Hunde zur jeweiligen Größen- und Gewichtskategorie ausgewiesen.

4.1.2 Altersverteilung

Die Tiere der Kontrollgruppe waren zwischen 2 (Fälle 1 bis 4) und 2,58 (Fall 5) Jahre alt. Die älteren Tiere dieser Studie (Fälle 6 bis 24) hatten ein Alter von 8 bis 19 Jahre erreicht. Das mittlere Lebensalter in Relation zur Körpergröße ergab 15.250 ± 0.750 Jahre bei kleinen (S), 14.875 ± 0.875 Jahre bei mittelgroßen (M) und 12.250 ± 1.130 Jahre bei großen (L) Hunden. Diese Daten repräsentieren die bekannte inverse Relation zwischen Alter und Größe von Hunden (GREER et al., 2007; GALIS et al., 2007). In Abbildung 4.1 ist das Alter der Hunde in Relation zur Größenkategorie dargestellt.

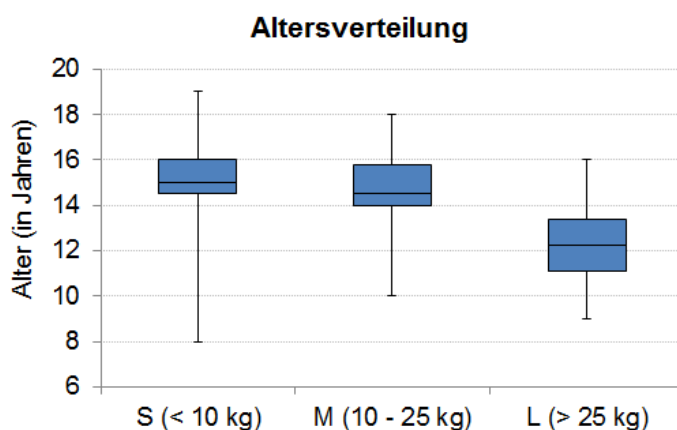


Abb. 4.1: Altersverteilung in den drei Kategorien

Hunde ab 8 Jahren wurden gemäß ihrer Größe und des Gewichtes in 3 Kategorien unterteilt: kleine (S, < 10 kg), mittelgroße (M, 10 - 25 kg) und große (L, > 25 kg) Hunde. Zwischen den Kategorien zeigten sich Unterschiede im Lebensalter der Hunde.

4.1.3 Symptomatik

Einige der alten Hunde zeigten klinische Symptome, die dem des caninen kognitiven Dysfunktionssyndroms entsprechen. Im Fall 10 wurde von zeitweiser Verwirrung und Desorientierung berichtet. Fall 13 war erblindet, zeitweise apathisch und desorientiert. Fall 16 zeigte Stupor, Verwirrung, Desorientierung in vertrauter Umgebung und Beeinträchtigungen des motorischen und vestibulären Systems. Fall 21 war inkontinent, zeitweise orientierungslos und zeigte Störungen der Wahrnehmung sowie motorische Beeinträchtigungen.

4.2 Pathologisch-histologische Untersuchung der Gehirne

4.2.1 Altersabhängige pathologische Gehirnveränderungen

Die Gehirne der alten Hunde (Fälle 8 - 24) zeigten im Vergleich zu den jüngeren Tieren (Fälle 6 und 7) und Hunden der Kontrollgruppe (Fälle 1 - 5) erweiterte Sulci und verstrichene Gyri mit unterschiedlicher Ausprägung. Zusätzlich waren bei vier Hunden, die älter als 13 Jahre waren (Fälle 14, 17, 19 und 24), die lateralen Hirnventrikel im Bereich der Hippokampusformation mittel- bis hochgradig erweitert (Abb. 4.2). Geringgradige Sklerosierungen der meningealen Gefäße wurden bei Hunden ab einem Alter von 11 Jahren beobachtet. Tiere ab einem Alter von 14 Jahren (Fälle 13 - 24) wiesen mittel- bis hochgradige Vasculopathien der meningealen Gefäße mit Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust der Gefäßwände infolge einer Sklerosierung auf (Abb. 4.2).

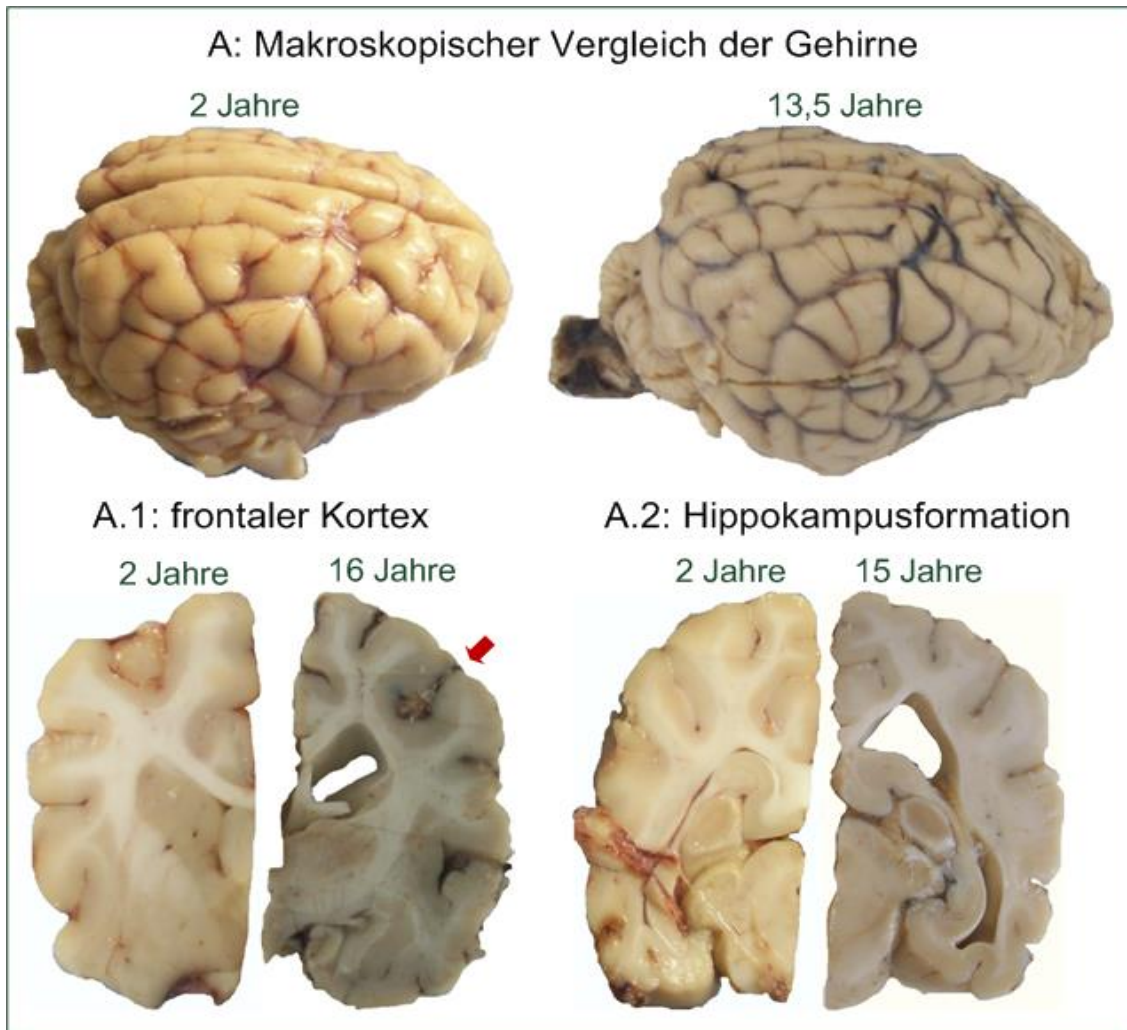


Abb. 4.2: Vergleichende Darstellung der Gehirne und Gehirnschnitte

Die Gehirne des Kontrolltieres (Fall 2) und der alten Hunde wurden mittels 4 % PFA fixiert. A) Makroskopisch ist ein Verstreichen der Gyri bei einem 13,5 Jahre alten Hund (Fall 12) zu erkennen. A.1) Ein 16 Jahre alter Hund (Fall 19) wies Sklerosierungen der meningealen Gefäße auf (roter Pfeil). A.2) Auf Höhe der Hippokampusformation wies ein 15 Jahre alter Hund (Fall 17) eine hochgradige Erweiterung der lateralen Hirnventrikel auf.

4.2.2 Anteil der grauen Substanz des frontalen Kortex

Die Untersuchung des Anteils der grauen Substanz am neuronalen Gewebe des frontalen Kortex zeigte, dass große und mittelgroße Hunde im Vergleich zu kleinen Hunden und Kontrolltieren einen geringeren Anteil besaßen (Abb. 4.3). Die Unterschiede waren jedoch im Gruppenvergleich nicht signifikant.

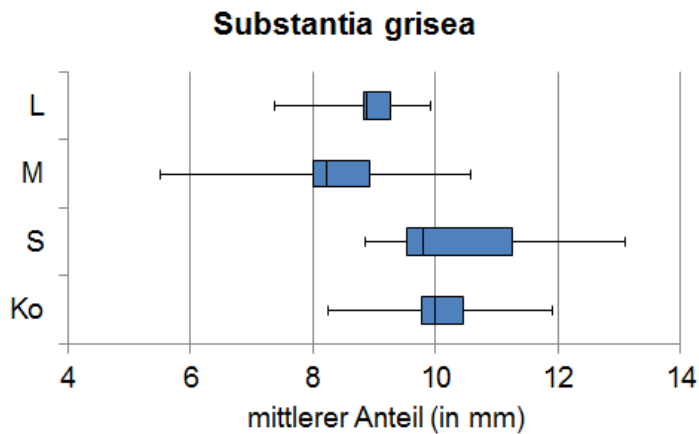


Abb. 4.3: Mittlerer Anteil der Substantia grisea des frontalen Kortex

In den drei Kategorien und der Kontrollgruppe (Ko) war der Anteil der grauen Substanz unterschiedlich ausgeprägt. Hunde der Kategorie S und Kontrolltiere besaßen einen höheren Anteil gegenüber Tieren der Kategorien M und L.

4.2.3 Pathologisch-histologische Charakterisierung ausgewählter Hirnareale

Mittels der H&E-Färbung wurden die Gehirne aller Hunde (Fälle 1 - 24) im Hinblick auf pathologisch-histologische Veränderungen charakterisiert und ausgewählte Parameter semiquantitativ erfasst. Die Leptomeninx wurde auf das Vorhandensein bindegewebiger Zubildungen und den Grad der Fibrose untersucht. Die Analyse der Neurone des frontalen Kortex und der Hippokampusformation erfolgte im Hinblick auf intrazelluläre Lipofuszinablagerungen, Hirano-Körperchen und granulovakuoläre Degenerationen nach Simchowitz. Die graue Substanz des Neokortex wurde auf Mikroblutungen und die weiße Substanz auf die Existenz von eosinophilen Kügelchen und Sphäroiden untersucht.

4.2.3.1 Kontrollgruppe

Die Gehirne der Kontrollgruppe (Fälle 1 - 5) wiesen keine altersabhängigen pathologisch-histologischen Veränderungen auf. Eine Fibrose der Meningen wurde nicht beobachtet. Die Neuronen des frontalen Kortex und des Hippokampus waren frei von Lipofuszinablagerungen, granulovakuolären Degenerationen und Hirano-Körperchen. Kein Hund der Kontrollgruppe wies Mikroblutungen der grauen Substanz auf. Auch die weiße Substanz war frei von altersassoziierten Pathologien wie eosinophilen Kügelchen und Sphäroiden.

4.2.3.2 Gehirne der alten Hunde

Eine gering- bis mittelgradige Verbreiterung der Leptomeninx infolge einer aktiven Zubildung von Bindegewebe wurde bei Hunden ab 9 Jahren (Fälle 7 - 24) beobachtet (Abb. 4.4). Dies entspricht einem Anteil von 95 % der alten Hunde. Intraneuronale Ablagerungen des Alterspigments Lipofuszin waren bei 95 % der Hunde ab einem Alter von 9 Jahren nachweisbar und stellten sich als hellbräunliche, nahe dem Zellkern gelegene Akkumulate, insbesondere in den Riesenpyramidenzellen des Stratum pyramidale internum (V) des frontalen Kortex dar. Bei einigen Neuronen war der Zellkern durch Lipofuszinablagerungen nach peripher verlagert (Abb. 4.4). Auch wiesen 63 % der Hunde perivaskuläre Zellen mit Lipofuszineinschlüssen auf.

Mikroblutungen der grauen Substanz wurden in 4 Fällen (8, 13, 16 und 20) beobachtet, was einem Anteil von 20 % der alten Hunde entspricht. In der weißen Substanz der alten Hunde fanden sich keine Veränderungen in Form von eosinophilen Kügelchen oder Sphäroiden.

Im Hippokampus der alten Tiere (Fälle 13 - 24) war generell die Körnerschicht des Gyrus dentatus geringgradig schmaler im Vergleich zu der des Gyrus dentatus jüngerer Hunde (Fälle 6 - 12) und der Kontrolltiere (Fälle 1 - 5). Pyramidenzellen der Regionen CA2 und CA1 zeigten bei 32 % der Hunde vereinzelt hellbräunliche, intraneuronale Ablagerungen in Form von Lipofuszin (Abb. 4.4). Plaques mit einem zentralen Kern aus eosinophilen A β , die als klassische Plaques bezeichnet werden, konnten bei keinem Hund nachgewiesen werden. Hinweise auf das Vorhandensein von neurofibrillären Bündeln fanden sich bei zwei Hunden (Fälle 16 und 18). Bei diesen Tieren wurden in den Pyramidenzellen der dorsalen und ventralen Hippokampi basophile, fibrilläre Strukturen im Zellkörper und den Fortsätzen beobachtet, die ein flammenförmiges Aussehen hatten (Abb. 4.4). Granulovakuoläre Degenerationen nach Simchowitz und Hirano-Körperchen wurden in keinem Fall nachgewiesen.

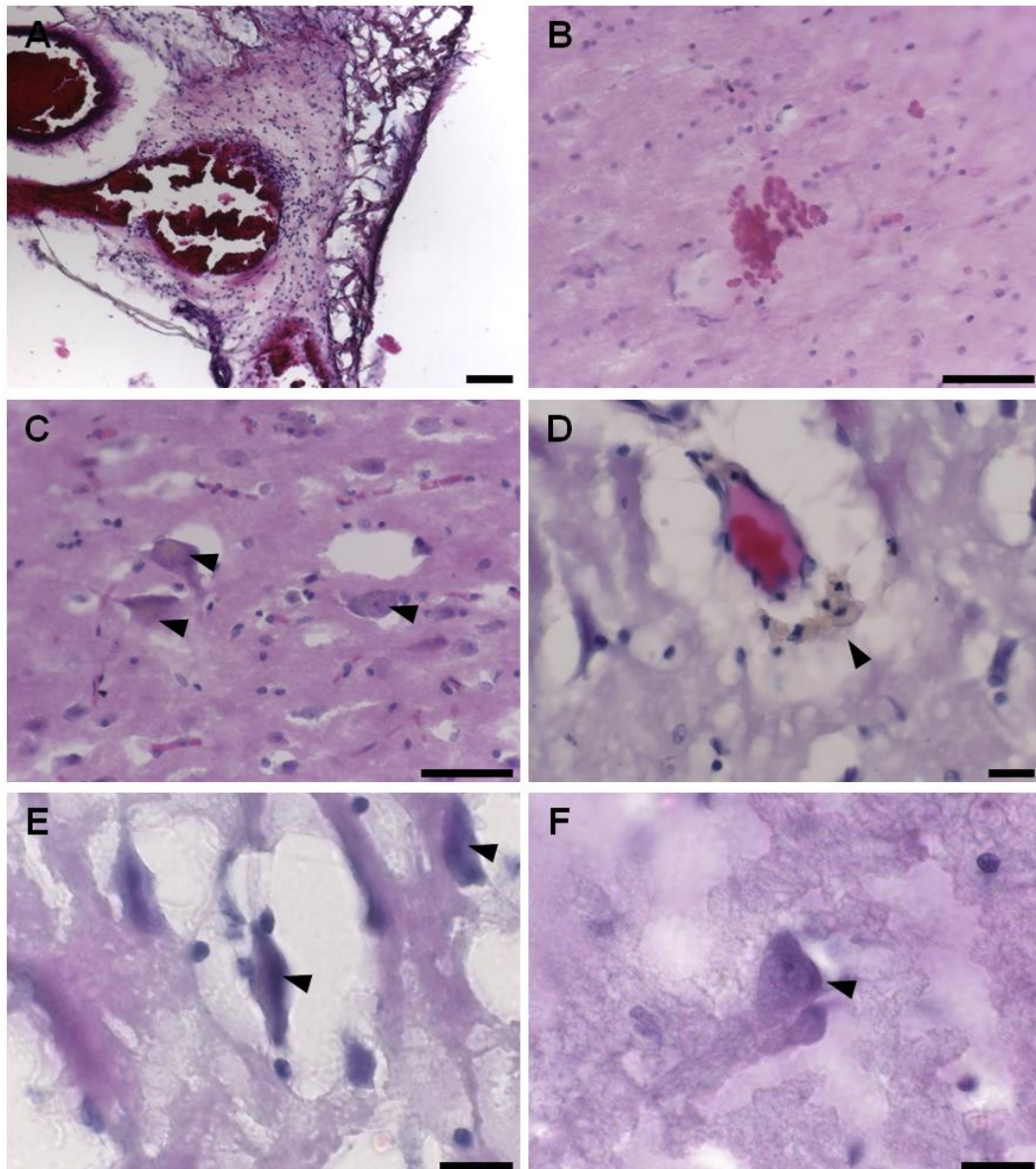


Abb. 4.4: Altersassoziierte Pathologien des Neo- und Archikortex, dargestellt mittels H&E-Färbung

A) Mittelgradige Fibrose der Leptomeninx (Fall 12). B) Mikroblutungen der grauen Substanz bei einem 14 Jahre alten Hund (Fall 13). C) Intraneuronale Lipofuzineinlagerungen in den Zellen des kortikalen Stratum V (Pfeilspitzen) von Fall 13 und D) in perivaskulären Zellen (Pfeilspitze) von Fall 15. E) Basophile, fibrilläre Strukturen in den Pyramidenzellen des ventralen Hippokampus von Fall 18 und F) von Fall 16 (Pfeilspitzen). Maßstabsbalken: 100 μm (A); 50 μm (B - D); 20 μm (E, F).

4.2.3.3 Korrelation der altersassoziierten Neuropathologie mit der Größen- und Gewichtskategorie

Unspezifische, altersassoziierte Befunde wie Meninxfibrosen, Lipofuszinablagerungen in den Riesenpyramidenzellen des Stratum V und eine Atrophie der

Körnerzellschicht des Gyrus dentatus konnten bei Tieren der drei Kategorien beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu waren parenchymale Mikroblutungen und Lipofuszinablagerungen in den Pyramidenzellen des Cornu ammonis bei keinem der untersuchten großen Hunde sichtbar. Allerdings zeigten kleine und mittelgroße Hunde diese pathologischen Befunde im frontalen Kortex und in der Hippokampusformation.

4.2.3.4 Statistische Auswertung

Analysen über das Auftreten von Lipofuszinablagerungen in den Neuronen des frontalen Kortex mittels des Chi-Quadrat-Tests ergaben einen hohen signifikanten Unterschied mit einem P-Wert von $< 0,001$ zwischen den untersuchten Größenkategorien und der Kontrollgruppe. Die Teststärke mit $\alpha = 0,05$ betrug 97,9 %.

Ein deutlicher Unterschied mit $P = 0,019$ bestand zwischen dem Vorhandensein von Lipofuszinablagerungen in perivaskulären Zellen von 12 Hunden und der fehlenden Beobachtung dieser Veränderung in den Gehirnen der Kontrollgruppe und 7 Hunden unterschiedlicher Größe. Die Sensitivität des durchgeführten Chi-Quadrat-Tests betrug 75,9 %.

Das Auftreten von Mikroblutungen in der grauen Substanz bei vier alten Hunden war statistisch gesehen nicht signifikant.

4.3 Detektion, Charakterisierung und Quantifizierung des A β -Proteins

4.3.1 Immunhistochemische Darstellung des A β -Proteins

4.3.1.1 Kontrollgruppe

Untersucht wurden der frontale und entorhinale Kortex sowie die Hippokampusformation der Kontrollgruppe hinsichtlich des Auftretens der A β -Subtypen pE3A β und A β_{8-17} . Dabei wurden weder parenchymale A β -Ablagerungen noch gefäßassoziiertes A β gefunden.

4.3.1.2 Altersassoziierte Verteilung der A β -Ablagerungen

Bei Hunden ab einem Alter von 9 Jahren (Fälle 7 bis 24) zeigten sich A β -Ablagerungen mit unterschiedlichem Schweregrad. Das Verteilungsmuster der verschiedenen A β -Subtypen A β ₈₋₁₇ und pE3A β war identisch in den untersuchten Regionen frontaler Kortex, Hippokampus und entorhinaler Kortex.

Die Bewertung parenchymaler Plaques erfolgte in 4 Stadien nach SATOU et al., 1997. Stadium 1 war gekennzeichnet durch vereinzelte, großflächige, diffuse A β -Plaques in den kortikalen Strata VI und V.

Im Stadium 2 wurden vermehrt größere diffuse Plaques in den kortikalen Strata VI und V beobachtet. Aufgrund ihrer Tendenz zu fusionieren, erreichten sie einen Durchmesser von bis zu 400 μ m und traten gelegentlich auch in den Strata IV und III auf. In Kombination zu den diffusen Plaques hatten sich in den tieferen kortikalen Schichten A β -immunopositive, fibrilläre Strukturen ausgebildet.

Das Stadium 3 wurde durch zwei Subtypen von Plaques charakterisiert. Disseminierte, diffuse Plaques waren vornehmlich im Stratum III zu beobachten. Daneben traten 7 bis 100 μ m große Plaques in den kortikalen Strata III bis I auf. Diese sogenannten primitiven Plaques unterschieden sich von diffusen Plaques durch die runde Form, das granuläre A β und die klar erkennbare Abgrenzung gegenüber dem umliegenden Gewebe.

Im Stadium 4 befanden sich keine diffusen Plaques in den tieferen kortikalen Schichten. Dafür lagen primitive Plaques in allen kortikalen Schichten vor.

Im Gehirn eines 8 Jahre alten Hundes (Fall 6) konnten keine parenchymalen und gefäßassoziierten A β -Ablagerungen beobachtet werden.

Leptomeningeale Gefäße des Neokortex wiesen bei Hunden ab 9 Jahren (Fälle 7 - 24) A β -Ablagerungen auf. Dabei befand sich A β beider Subtypen in der Gefäßwand kleinerer und größerer Gefäße, die bis in das Stratum moleculare des frontalen Kortex verliefen.

Im frontalen Kortex zweier Hunde im Alter von 9 und 11 Jahren (Fälle 7 und 9) zeigten sich nur vereinzelt vorliegende diffuse Plaques, die in den Strata pyramidale interne (V) und multiformum (VI) verschiedener Gyri vorlagen und dem Satou-Stadium 1 entsprachen. Wenige kleinere Gefäße hatten A β -Ablagerungen in der Gefäßwand.

Ergebnisse

Der Hippokampus eines 9 Jahre alten Hundes (Fall 7) war frei von A β -Ablagerungen. A β -positive Neurone wurden im Stratum pyramidale des Cornu ammonis eines 11 Jahre alten Hundes (Fall 9) beobachtet. Zusätzlich lagen wenige diffuse Plaques im Stratum oriens nahe der Fimbria vor (Abb. 4.5).

Der entorhinale Kortex des 9 Jahre alten Hundes (Fall 7) war nicht von A β -Ablagerungen betroffen. Von Fall 9 lag kein entorhinaler Kortex zur Untersuchung vor.

Bei einem 10 Jahre alten Hund (Fall 8) waren im gesamten frontalen Kortex diffuse Plaques in den Laminae V und VI zu beobachten, die sich stellenweise zu größeren Ablagerungen zusammenschlossen und von wolkigen A β -Peptiden umgeben waren. Primitive Plaques lagen in den Strata granulare internum (IV) bis granulare externum (II) vor. Anhand der beschriebenen Pathologie wurde dieser Hund dem Satou-Stadium 3 zugeordnet. Zusätzlich besaß das Tier eine große Menge gefäßassoziiertes A β in allen kortikalen Schichten.

Im Hippokampus waren diffuse Plaques als bandartige Strukturen innerhalb des Stratum moleculare des Gyrus dentatus zu beobachten. Über diffuses A β waren die Plaques verbunden. Im Stratum lacunosum-moleculare des Cornu ammonis gelegene diffuse Plaques waren parallel zu den Plaques des Gyrus dentatus lokalisiert. In den Regionen CA2 und CA1 lockerte sich der Verband aus diffusen Plaques, die auch vereinzelt im Stratum radiatum auftraten. Zusätzlich besaß dieser Hund gefäßassoziiertes A β im Stratum lacunosum-moleculare.

In den Laminae II, III und V des entorhinalen Kortex fanden sich kleine körnige, regelmäßig angeordnete A β -Ablagerungen, die als „fleecy A β “ bezeichnet werden. Zusätzlich lagen gefäßassoziierte Ablagerungen vor.

Bei Hunden im Alter von 11,5 bis 13,5 Jahren (Fälle 10 bis 12) lagerte sich A β vorrangig in den Gyri marginalis und postcruciatum mit unterschiedlichem Schweregrad ab. Fall 12 entsprach dem Satou-Stadium 3, wobei diffuse Plaques in den kortikalen Strata V und VI und primitive Plaques mit einem dichten Kern aus A β in den Strata IV bis II vorlagen. An einigen Stellen der grauen Substanz lagen clusterartig Gefäße mit A β -Ablagerungen in den Gefäßwänden vor. Fall 10 besaß ausschließlich primitive Plaques und entsprach dem Satou-Stadium 4. Dem Satou-Stadium 1 entsprechend, wurden bei einem 13 Jahre

Ergebnisse

alten Hund (Fall 11) diffuse Plaques in den Laminae V und VI detektiert, denen ein kompakter A β -Kern fehlte.

Im Stratum moleculare des Gyrus dentatus der 11,5 bis 13,5 Jahre alten Tiere lagen diffuse Plaques vor. Bei zwei Hunden (Fälle 10 und 12) besaßen diese Ablagerungen einen großflächigen Hof aus diffusen A β . Im Cornu ammonis befanden sich vereinzelt diffuse Plaques in den Strata lacunosum-moleculare und radiatum. Fall 11 besaß zudem einige A β -positive Pyramidenzellen und gefäßassoziiertes A β im Stratum lacunosum-moleculare.

Im entorhinalen Kortex der Fälle 10 bis 12 fanden sich wenige diffuse Plaques in den Strata II und III. Im Stratum V lag „fleecy A β “ vor. Zusätzlich besaß Fall 12 clusterartig vorliegende, gefäßassoziierte A β -Ablagerungen (Abb. 4.7).

Im frontalen Kortex von 14 und 15 Jahre alten Hunden (Fälle 13 bis 18) wurden Plaques in der grauen Substanz aller Gyri beobachtet, allerdings war auch bei diesen Tieren die Pathologie im Gyrus marginalis und Gyrus postcruciatum am stärksten ausgeprägt. Anhand dieser pathohistologischen Kriterien wurde das Satou-Stadium bestimmt. Wenige isoliert vorliegende diffuse Plaques in den kortikalen Strata V und VI fanden sich in den Fällen 15, 16 und 18 (Satou-Stadium 1). Zwei 14 Jahre alte Hunde (Fälle 13 und 14) wiesen bis zu 400 μ m große, diffuse Plaques auf, die sich als wolkige, fusionierte Gebilde darstellten. Zusätzlich formierten sich primitive Plaques, die bis ins Stratum II reichten. Damit entsprachen diese Hunde dem Satou-Stadium 3. Ausschließlich primitive Plaques wurden bei einem 15 Jahre alten Pudel beobachtet (Fall 17), deren Ausbreitung von Stratum IV bis II reichte (Satou-Stadium 4). Einige Tiere ab 14 Jahre (Fälle 14, 16 - 18) waren zudem von CAA in den kortikalen Strata III bis VI betroffen.

Im Hippokampus der 14 und 15 Jahre alten Hunde (Fälle 13 bis 18) wurden diffuse Plaques im Stratum moleculare des Gyrus dentatus und Stratum lacunosum-moleculare des Cornu ammonis dokumentiert. Bei Tieren über 13 Jahre (Fälle 13 - 16, 18) waren Plaques des Gyrus dentatus von diffusen A β umgeben. Bei einem 14 Jahre alten Pit Bull (Fall 15) lagen diffuse Plaques im Stratum lacunosum-moleculare parallel zu den bandartigen Ablagerungen des Gyrus dentatus vor. In den Regionen CA4 bis CA3 besaßen die Plaques eine breite Ausdehnung und waren von diffusem A β umgeben. In CA2 und CA1

Ergebnisse

lagen die Plaques isoliert in den Strata lacunosum-moleculare und radiatum vor. Das Stratum radiatum der Fälle 13, 14, 16 und 18 wies keine A β -Ablagerungen auf.

Der entorhinale Kortex einiger Hunde ab 14 Jahren (Fälle 13, 14 und 16) enthielt diffuse Plaques in den Strata II und III. Zusätzlich wurde gefäßassoziiertes A β im Stratum V der Fälle 14, 16 und 17 beobachtet. Von zwei 14 beziehungsweise 15 Jahre alten Hunden (Fälle 15 und 18) lag kein entorhinaler Kortex zur Untersuchung vor.

Tiere mit einem Alter zwischen 16 und 19 Jahren (Fälle 19 bis 24) zeichneten sich durch eine generalisierte Verteilung des A β im frontalen Kortex aus. Bei diesen Tieren zeigte sich keine Präferenz eines Gyrus gegenüber Ablagerungen von A β . Die Einteilung in die Satou-Stadien erfolgte anhand der Neuropathologie des frontalen Kortex und wies Unterschiede zwischen den einzelnen Hunden auf. Zwei Hunde im Alter von 16 und 18 Jahren (Fälle 22 und 23) wurden dem Satou-Stadium 2 zugeordnet, wobei diffuse Plaques in keinem Gyrus außerhalb der Strata VI und V lokalisiert waren. Das Satou-Stadium 3 traf auf die Fälle 20 und 24 zu, die 16 beziehungsweise 19 Jahre alt waren. Bei diesen Tieren wurden neben diffusen Plaques in den Strata VI bis IV auch primitive Plaques beobachtet, deren Ausbreitung sich bis ins Stratum pyramidale externum (III) vollzog. Ausschließlich primitive Plaques wurden bei zwei 16 Jahre alten Hunden (Fälle 19 und 21) beobachtet, die auch im Stratum I detektiert wurden (Abb. 4.5 F). Sie wurden dem Satou-Stadium 4 zugeordnet. CAA trat in den kortikalen Strata II bis VI der Fälle 20 und 22 bis 24 auf.

Hunde ab einem Alter von 16 Jahren (Fälle 19 - 22, 24) wiesen die bereits beschriebenen bandartigen A β -Ablagerungen im Stratum moleculare des Gyrus dentatus auf. Im Hippokampus wurden in zwei Fällen (20 und 22) zusätzlich A β -positive Körnerzellen im Stratum granulare beobachtet. Das Cornu ammonis eines 16 Jahre alten Mischlingshundes (Fall 22) wies keine A β -Plaques auf. Gefäßassoziiertes A β wurde im Stratum lacunosum-moleculare zweier Hunde (Fälle 19 und 20) dokumentiert. In den Gehirnen der Fälle 20 und 24 waren diffuse Plaques des Stratum lacunosum-moleculare bandartig wie die des Gyrus dentatus formiert. In den Regionen CA4 und CA3 waren die Plaques über einen großflächigen Hof aus diffusem A β verbunden. In CA2 und CA1

Ergebnisse

waren in den Fällen 19, 20 und 21 diffuse Plaques vereinzelt in den Strata lacunosum-moleculare und radiatum lokalisiert.

Der Hippokampus eines 18 Jahre alten Mischlingshundes (Fall 23) war frei von A β -Plaques und besaß nur wenige A β -positive Zellen im Stratum lacunosum-moleculare.

Im entorhinalen Kortex der Hunde ab 16 Jahre (Fälle 19, 22-24) waren 50 μ m kleine diffuse Plaques in den Strata II, III und V zu beobachten. Fall 21 besaß ausschließlich primitive Plaques im entorhinalen Kortex. Gefäßassoziiertes A β wurde im Stratum V der alten Hunde (Fälle 20, 22, 23 und 24) detektiert.

Ergebnisse

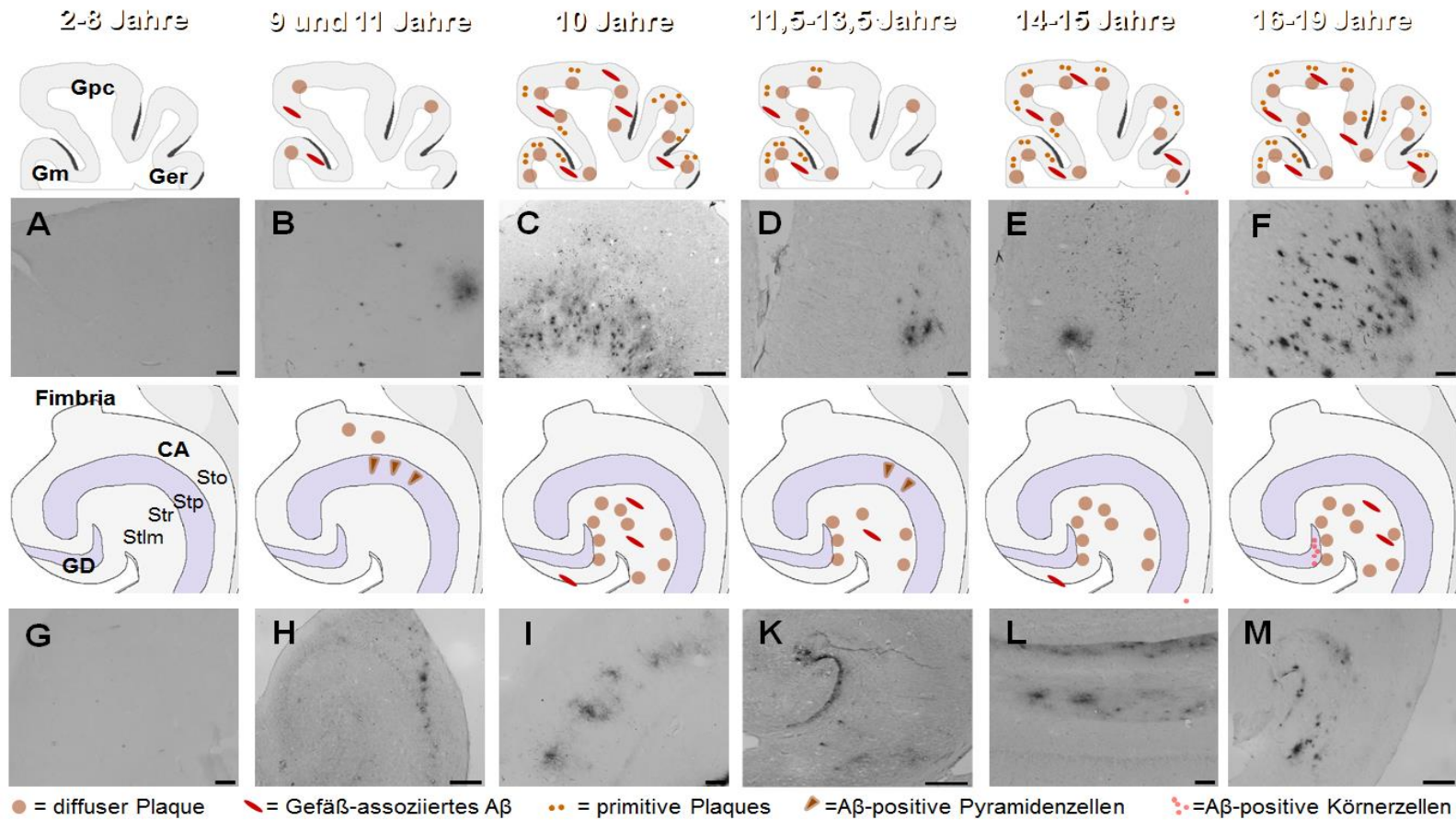


Abb. 4.5: Schematische Darstellung einer altersassoziierten Aβ-Pathologie bei Hunden von 2 bis 19 Jahren

Pathologische Befunde entsprechend den Schemata sind im frontalen Kortex (A - F) und Hippokampus (G - M) dargestellt. Die Detektion der Aβ-Ablagerungen erfolgte mit Antikörpern gegen Aβ₈₋₁₇ und pE3Aβ.

Gm = Gyrus marginalis; Gpc = Gyrus postcruciatu; Ger = Gyrus ectomarginalis rostralis; GD = Gyrus dentatus; CA = Cornu ammonis; Sto = Stratum oriens; Stp = Stratum pyramidale; Str = Stratum radiatum; Stlm = Stratum lacunosum-moleculare.

Maßstabsbalken: 200 µm (A, B, D – G, I, L); 600 µm (C, H, K, M).

4.3.2 Morphologie der A β -Ablagerungen

Plaques, bestehend aus den untersuchten A β -Subtypen pE3A β und A β_{8-17} , besaßen zwar das gleiche Verteilungsmuster innerhalb des Neo- und Archikortex, wiesen allerdings eine unterschiedliche Morphologie auf. Diffuse A β_{8-17} -enthaltende Plaques des frontalen Kortex bestanden aus homogenen, diffusen A β , das sich unscharf vom umgebenden Parenchym abgrenzen ließ. Diesen Plaques fehlte ein dichter A β -Kern (Abb. 4.6 A). Durch Fusion der diffusen Plaques erreichte ihr Durchmesser mitunter bis zu 220 μ m. Im Gegensatz dazu waren diffuse Ablagerungen aus pE3A β kompakter und besaßen einen kondensierten A β -Kern, der von diffusen und faserigen A β umgeben war. Auch diffuse pE3A β -enthaltende Plaques wiesen keine klare Abgrenzung gegenüber dem umliegenden Parenchym auf (Abb. 4.6 B).

Primitive A β_{8-17} -Plaques des Neokortex besaßen einen kondensierten Kern, der von einem schmalen Saum aus fibrillären A β_{8-17} umgeben war (Abb. 4.6 C). Der Durchmesser dieser Plaques reichte von 20 μ m bis 80 μ m. Die rundlichen primitiven Plaques aus pE3A β waren stark kondensiert und hatten einen maximalen Durchmesser von 65 μ m (Abb. 4.6 D).

Zerebrale gefäßassoziierte Ablagerungen aus pE3A β und A β_{8-17} fanden sich im frontalen Kortex von 11 Hunden im Alter von 10 bis 19 Jahren (Fälle 8 bis 24) und betrafen hauptsächlich die Gefäßwände kleinerer Blutgefäße und Kapillaren (Abb. 4.6 E, F). Größere Gefäße, die von Ablagerungen beider A β -Subtypen A β_{8-17} und pE3A β betroffen waren, lagen in der Leptomeninx vor (Abb. 4.6 G, H).

Im Stratum moleculare des Gyrus dentatus zeigten pE3A β - und A β_{8-17} -enthaltende Plaques eine einheitliche Morphologie. Sie lagen als bandartige Struktur vor, die aus körnigem A β bestand, welches sich vereinzelt zu diffusen Plaques verdichtete (Abb. 4.7 C, D). Plaques des Cornu ammonis unterschieden sich hinsichtlich der Kondensation des A β . Diffuse A β_{8-17} -enthaltende Plaques waren gekennzeichnet von relativ großflächig vorliegenden, homologen A β_{8-17} und einem geringgradig kondensierten Kern (Abb. 4.7 G). Im Gegensatz dazu wiesen diffuse Plaques aus modifiziertem pE3A β eine stärkere Kondensation der zentralen Komponenten auf, die von homolog verteilten, diffusen pE3A β umgeben waren (Abb. 4.7 H).

Ergebnisse

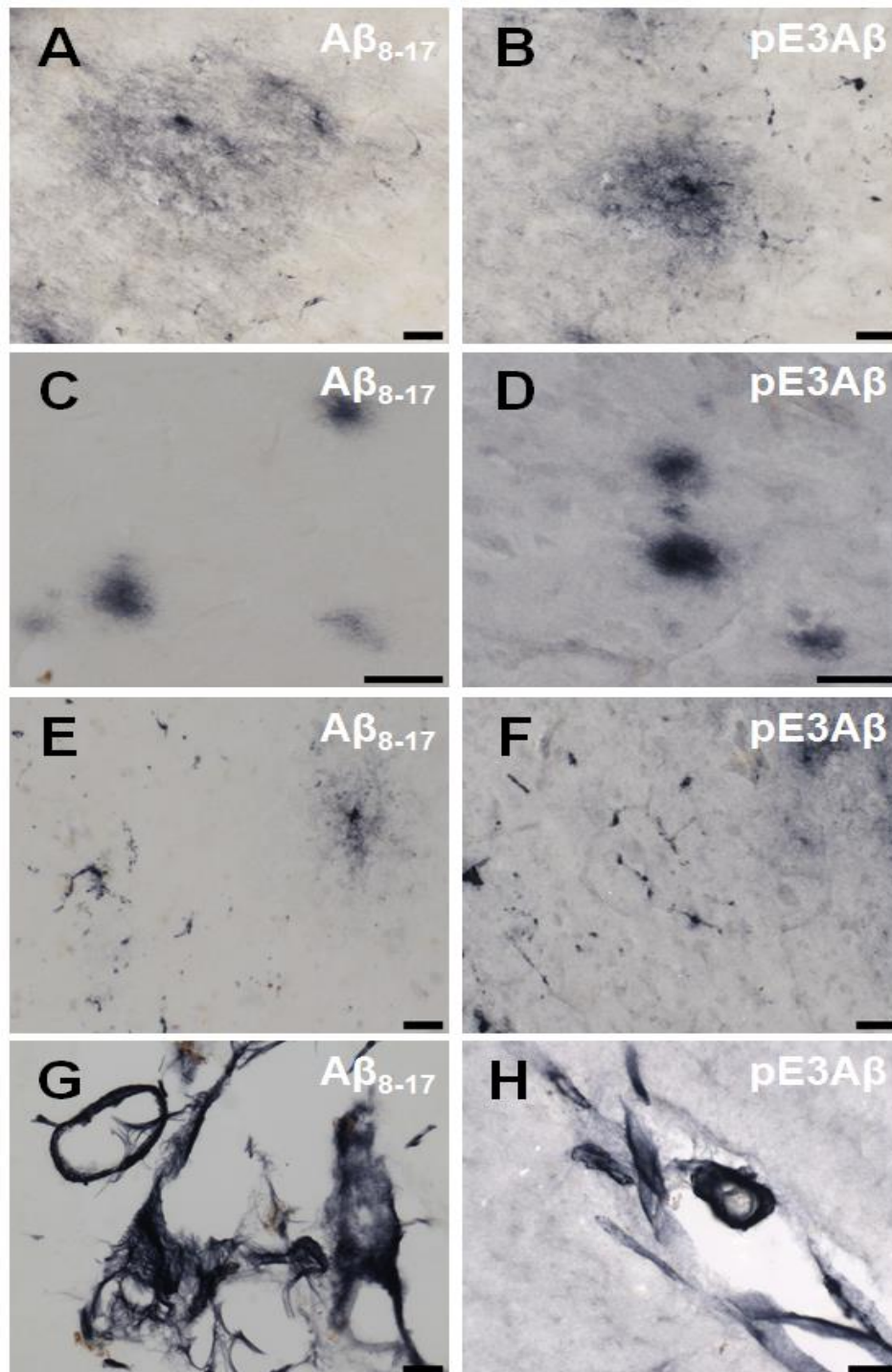


Abb. 4.6: Darstellung von A β -Ablagerungen im frontalen Kortex

Die Färbung der Ablagerungen erfolgte mittels ABC-Methode unter Verwendung von Antikörpern gegen A β_{8-17} und pE3A β . A) Diffuse A β_{8-17} -Plaques waren homogen und unklar vom Parenchym abzugrenzen. B) Dagegen schienen diffuse pE3A β -Plaques kondensierter. C, D) Primitive A β_{8-17} - und pE3A β -Plaques besaßen einen Kern aus kondensiertem A β , der von einem schmalen Saum aus fibrillären A β umgeben war. E, F) Ablagerungen von A β_{8-17} und pE3A β fanden sich in Wänden kleinerer parenchymaler Gefäße. G, H) Größere Gefäße der Leptomeninx wiesen Ablagerungen von A β_{8-17} und pE3A β auf. Maßstabsbalken: 60 μ m (A, B, E, F, H); 50 μ m (C, D); 100 μ m (G).

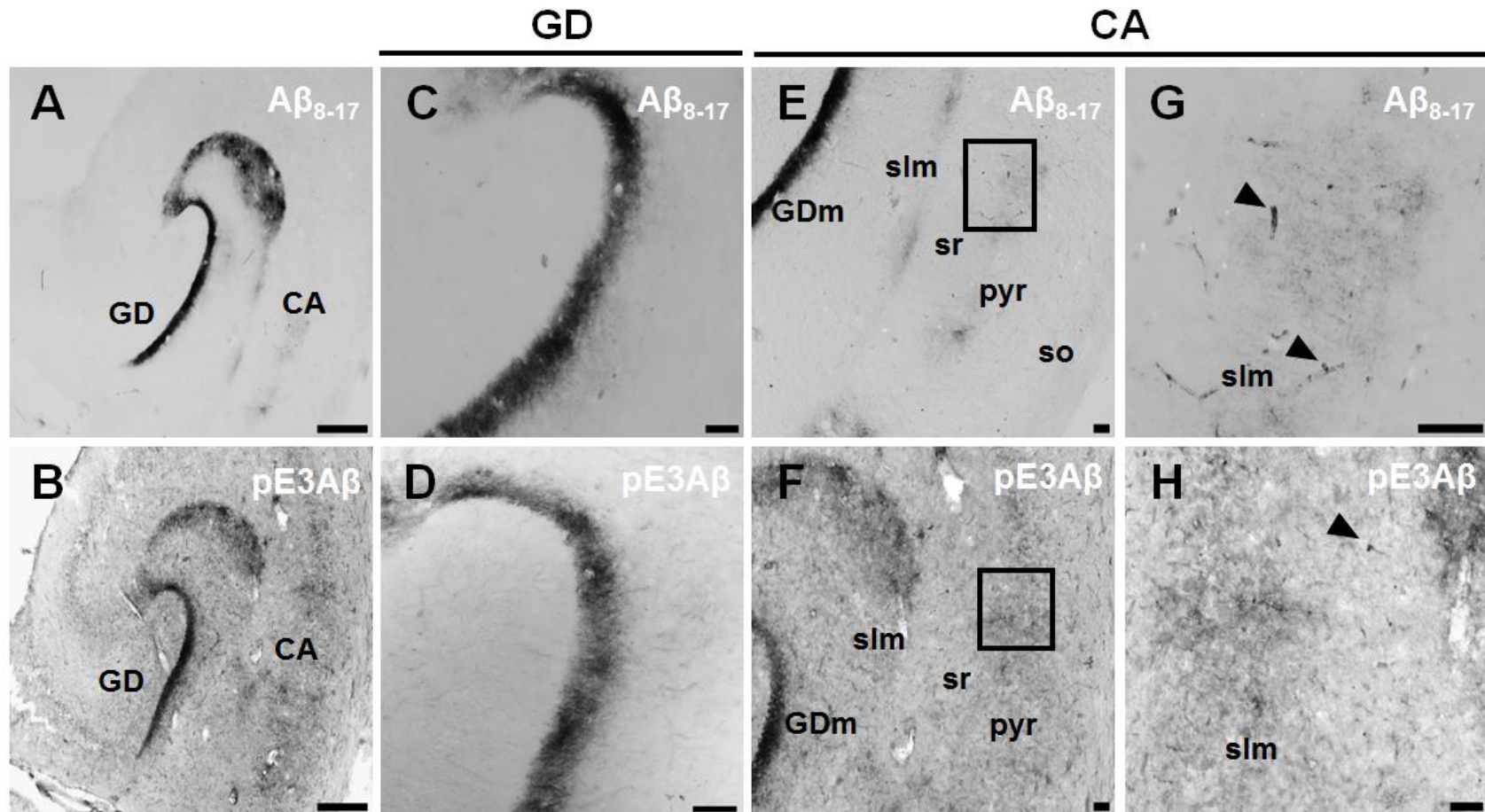


Abb. 4.7: Ablagerungen von A β im ventralen Hippokampus

Unter Verwendung von Antikörpern gegen A β_{8-17} und pE3A β wurden A β -Ablagerungen im ventralen Hippokampus markiert. A, B) A β_{8-17} -positive Ablagerungen in der Übersicht. C, D) Bandartige diffuse A β -Ablagerungen im Gyrus dentatus (GD). E, F) Diffuse Plaques in den Schichten des Cornu ammonis (CA). G, H) Unterschiede hinsichtlich der Kondensierung des A β in den diffusen Plaques des CA. Pfeilspitzen markieren gefäß-assoziiertes A β . Maßstabsbalken: 600 μ m (A, B, E, F); 100 μ m (C, D, G, H).

Ergebnisse

In den tieferen Schichten des entorhinalen Kortex besaßen A β -Ablagerungen aus pE3A β und A β_{8-17} die gleiche Morphologie. Sie lagen als sogenanntes „fleecy“-A β vor, das sich unscharf vom Neuropil abgrenzte und aus kleinen, körnigen, regelmäßig angeordneten A β -Peptiden bestand (Abb. 4.8).

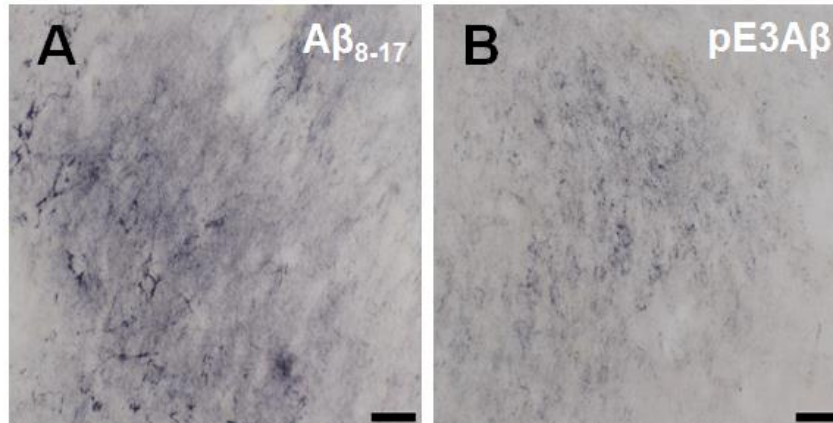


Abb. 4.8: Darstellung des „fleecy A β “ mit der ABC-Methode

A) A β_{8-17} -enthaltende „fleecy A β “-Plaques im entorhinalen Kortex eines 10 Jahre alten Mischlingshundes (Fall 8). B) „Fleecy A β “-Plaques, bestehend aus körnigen pE3A β im Stratum V des entorhinalen Kortex desselben Hundes. Maßstabsbalken: 60 μ m (A, B).

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die beobachteten Plaquetypen, deren morphologische Charakteristika und Häufigkeit in den Gehirnen alter Hunde.

Tab. 4.1: Morphologie der caninen senilen Plaques

Charakteristikum	Plaquetyp			
	diffus	primitiv	neuritisch	„fleecy“ A β
A β	homolog, z.T. mit verdichtetem faserigen A β -Kern	stark kondensiert, fibrillär	körniges A β mit diffuser Verteilung	körniges A β , großflächig homolog verteilt
Dystrophe Neuriten	keine	keine	vorhanden	keine
Regionen	graue Substanz des frontalen Kortex, Gyrus dentatus, Cornu ammonis, entorhinaler Kortex	graue Substanz des frontalen Kortex, entorhinaler Kortex	Cornu ammonis	entorhinaler Kortex
Häufigkeit	88,9 %	55,6 %	5,6 %	61,1 %
Alter bei erster Dokumentation	9 Jahre	10 Jahre	15 Jahre	10 Jahre

4.3.3 Assoziation der A β -Ablagerungen mit der Größen- und Gewichtskategorie

Mit Ausnahme der neuritischen Plaques fanden sich die beschriebenen Plaqueformen in den Gehirnen von kleinen, mittelgroßen und großen Hunden. Diffuse und „fleecy A β “-Plaques wurden im Neo- und Archikortex von Hunden der drei Größen- und Gewichtskategorien häufig beobachtet. Insbesondere im Neokortex von kleinen Hunden lagen primitive Plaques häufiger vor als bei mittelgroßen und großen Hunden. Allerdings besaß dieser Befund keine statistische Signifikanz.

4.3.4 Histochemische Darstellung des A β -Proteins

Im frontalen Kortex der alten Hunde zeigte die Kongorotfärbung eine spezifische Färbung von A β (Abb. 4.9). Dieses lag in der Tunica media meningearer und in der Gefäßwand kleinerer zerebraler Gefäße vor und erzeugte die charakteristische Doppelbrechung des polarisierten Lichtes mit gelblich-apfelgrünem Aufleuchten. Die Ergebnisse der Kongorotfärbung stimmten mit dem immunhistologischen Nachweis der A β -Subtypen pE3A β und A β ₈₋₁₇ in meningealen Gefäßen überein. Bei der Darstellung zerebraler gefäßassoziierter A β -Ablagerungen bestand eine Diskrepanz zwischen den wenigen Gefäßen, die sich mittels Kongorot anfärbten und dem immunhistologischen Nachweis zahlreicher A β -positiver Gefäße bei 7 alten Hunden (Fälle 12, 13, 19 - 24).

Zusätzlich konnten im frontalen Kortex der Hunde ab 9 Jahren (Fälle 7 - 24) einige kongophile Plaques beziehungsweise gefäßassozierte A β -Ablagerungen nachgewiesen werden, die im polarisierten Licht apfelgrün aufleuchteten (Abb. 4.9). In der Hippokampusformation und im entorhinalen Kortex der alten Hunde waren keine Plaques und gefäßassozierten Ablagerungen mittels Kongorotfärbung markiert und sichtbar.

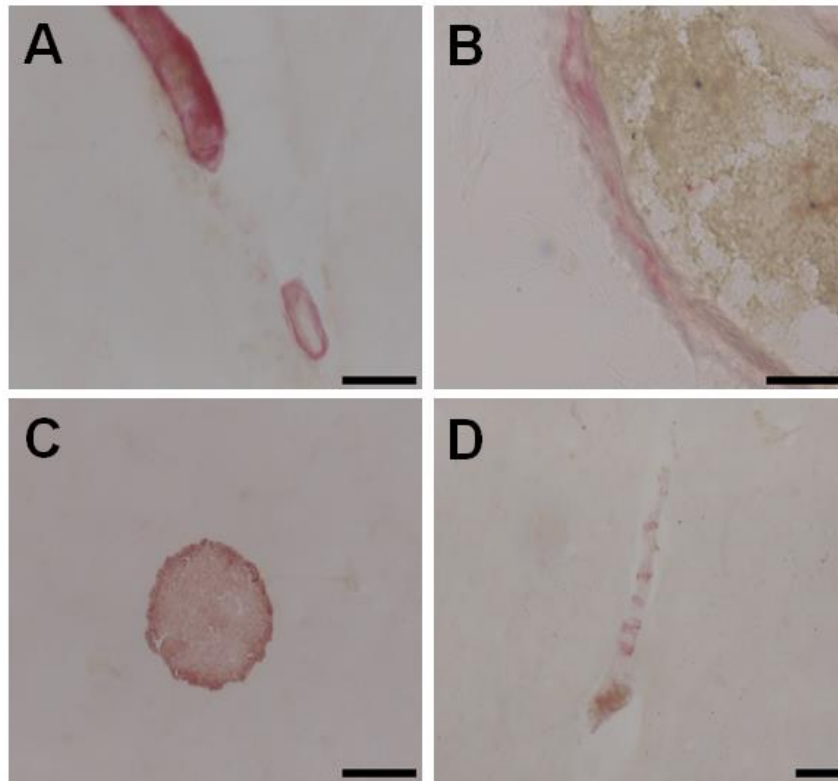


Abb. 4.9: Darstellung kongophiler A β -Ablagerungen mittels Kongorotfärbung

A) Größere meningeale Gefäße eines 16 Jahre alten Mischlingshundes (Fall mit kongophilem A β). B) Gefäßassoziierte A β -Ablagerungen in der Tunica media eines Gefäßes der Leptomeninx (Fall 12). C) Wenige parenchymale Plaques waren kongophil (Fall 11). D) Parenchymales Gefäß mit kongophilen A β -Ablagerungen (Fall 12). Maßstabsbalken: 50 μ m (A - C); 60 μ m (D).

4.3.5 Quantifizierung der A β -Ablagerungen

Die Quantifizierung der diffusen und primitiven pE3A β - oder A β ₈₋₁₇- enthaltenden Plaques sowie des gefäßassoziierten A β in den definierten Gehirnregionen erfolgte stereologisch mit dem Optical Fractionator. Die A β -Ablagerungen in den untersuchten Gehirnregionen wurden innerhalb der Versuchsgruppen verglichen. Zwei Hunde unter 10 Jahren (Fälle 6 und 7) zeigten keine quantifizierbaren neuropathologischen Befunde und wurden deshalb nicht in die Auswertung einbezogen.

Die Menge an A β -Ablagerungen, bestehend aus A β ₈₋₁₇ und pE3A β , in den definierten Gehirnregionen der alten Hunde war signifikant höher (jeweils $P < 0,01$) gegenüber den Befunden der Kontrolltiere, die keine A β -Ablagerungen zeigten. Generell und unabhängig von der Größen- und Gewichtskategorie der

Ergebnisse

Hunde wurden mehr pE3A β - als A β_{8-17} -immunreaktive parenchymale Plaques beobachtet ($P < 0,01$). Durchschnittlich lagen bei Hunden ab 10 Jahren 3,2/mm³ pE3A β -Plaques und 1,4/mm³ A β_{8-17} -Plaques in der grauen Substanz der ausgewerteten Gehirnregionen vor.

Im frontalen Kortex dominierten pE3A β -Plaques in den drei Gewichts- und Größenkategorien der alten Hunde. Die Dichte an pE3A β -Plaques in der grauen Substanz betrug bei kleinen Hunden 3,6/mm³, bei mittelgroßen Tieren 2,3/mm³ und 2,8/mm³ bei großen Hunden. Der Anteil an A β_{8-17} -Plaques war am geringsten bei kleinen und mittelgroßen Hunden und betrug 1,8/mm³ beziehungsweise 1,6/mm³. Hunde der Kategorie L besaßen 2,7/mm³ A β_{8-17} -Plaques, Abb. 4.10 A. Gefäße im frontalen Kortex wiesen vorrangig pE3A β -Ablagerungen auf. Bei kleinen Hunden waren durchschnittlich 3,5 Gefäße mit pE3A β - und 2,6 Gefäße mit A β_{8-17} -Ablagerungen pro mm³ vorhanden. Mittelgroße Hunde zeigten eine ähnliche Verteilung der Gefäßpathologie in der grauen Substanz mit 3,3 pE3A β - und 2,4 A β_{8-17} -enthaltenden Gefäßen pro mm³. Bei großen Hunden waren weniger Ablagerungen in der Gefäßwand zu beobachten. Ihre Dichte in der grauen Substanz betrug 1,4 pE3A β - und 0,9 A β_{8-17} -enthaltende Gefäße pro mm³ (Abb. 4.10 B).

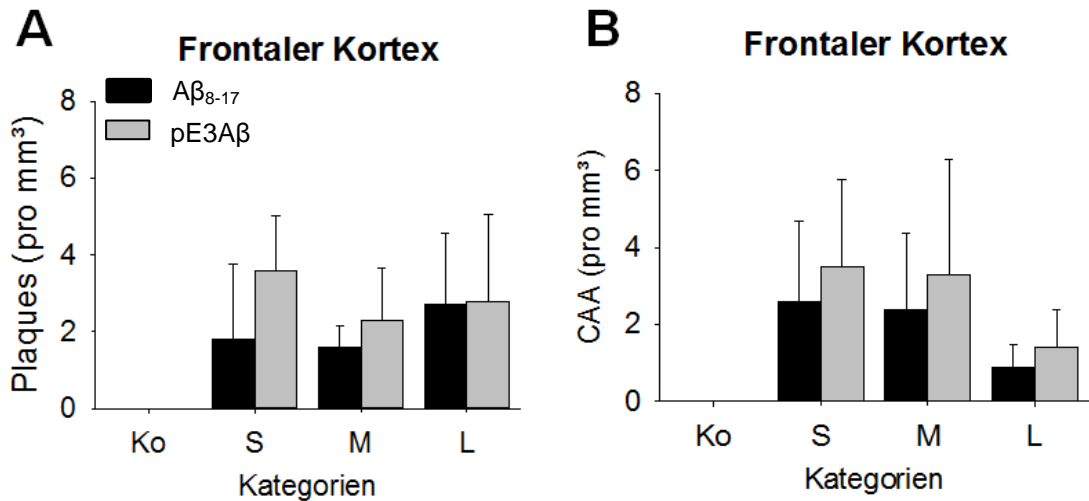


Abb. 4.10: Graphische Darstellung des mittleren Gehalts an Aβ₈₋₁₇ und pE3Aβ im frontalen Kortex

Parenchymale und gefäßassoziierte (CAA) Aβ-Ablagerungen wurden stereologisch im frontalen Kortex von kleinen (S), mittelgroßen (M) und großen (L) Hunden quantifiziert. In den Gehirnen der Kontrollgruppe (Ko) lagen keine Aβ-Ablagerungen vor. A) Im frontalen Kortex von Tieren der Kategorien S und M wurden häufig pE3Aβ-enthaltende Plaques beobachtet. Bei Hunden der Kategorie L war die Anzahl an pE3Aβ- und Aβ₈₋₁₇-enthaltenden Plaques im frontalen Kortex annähernd gleich. B) In den Gehirnen der drei Kategorien S, M und L befand sich vermehrt pE3Aβ in der Gefäßwand.

Im entorhinalen Kortex der Hunde aus den drei Größen- und Gewichtskategorien wurde eine höhere Menge an pE3Aβ- als an Aβ₈₋₁₇-enthaltenden Plaques gefunden. Bei kleinen Hunden war der Unterschied mit 3,2/mm³ pE3Aβ- gegenüber 0,9/mm³ Aβ₈₋₁₇-Plaques hoch signifikant ($P < 0,01$), Abb. 4.11 A. Mittelgroße Hunde wiesen 2,8/mm³ pE3Aβ-Plaques gegenüber 1,0/mm³ Aβ₈₋₁₇-Plaques im frontalen Kortex auf. Bei Hunden der Kategorie L betrug die Anzahl an pE3Aβ-Plaques 3,0/mm³ und an Aβ₈₋₁₇-Plaques 0,6/mm³.

Die höchste Dichte an gefäßassoziierten Ablagerungen im entorhinalen Kortex wurde bei mittelgroßen Hunden detektiert (Abb. 4.11 B). Sie besaßen 3,5 Aβ₈₋₁₇-CAA/mm³ und 3,3 pE3Aβ-CAA/mm³ gegenüber kleinen Hunden mit 1,2 Aβ₈₋₁₇-CAA/mm³ und 1,3 pE3Aβ-CAA/mm³ und großen Hunden mit 2,0 Aβ₈₋₁₇-CAA/mm³ und 1,4 pE3Aβ-CAA/mm³.

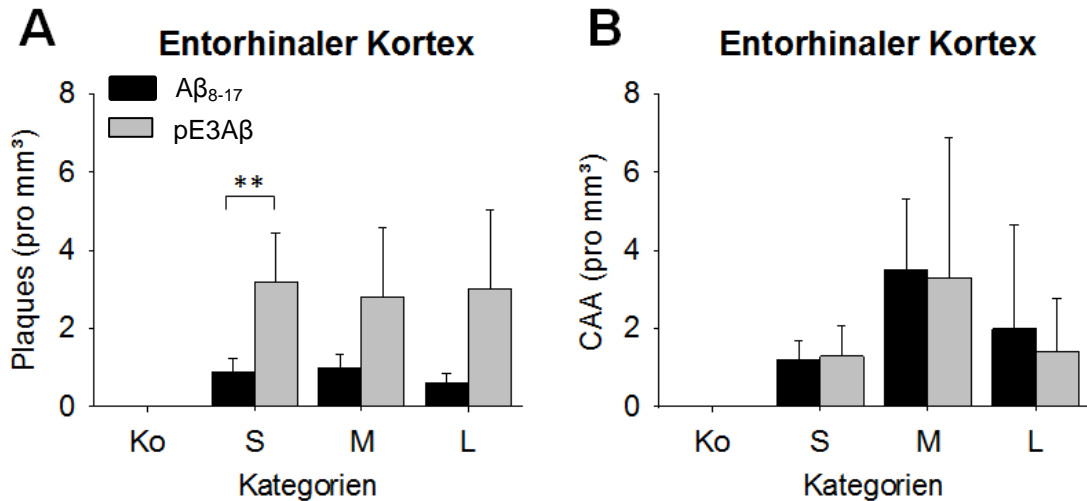


Abb. 4.11: Graphische Darstellung des mittleren Gehalts an Aβ₈₋₁₇ und pE3Aβ im entorhinalen Kortex

Die Quantifizierung von Plaques und gefäßassoziierten (CAA) Aβ-Ablagerungen erfolgte stereologisch im entorhinalen Kortex von kleinen (S), mittelgroßen (M) und großen (L) Hunden. Im entorhinalen Kortex der Kontrollgruppe (Ko) wurden keine Aβ-Ablagerungen detektiert. A) Plaques im entorhinalen Kortex setzten sich hauptsächlich aus pE3Aβ zusammen. In Gehirnen von kleinen Hunden war der Unterschied zwischen dem vermehrten Auftreten von pE3Aβ- gegenüber Aβ₈₋₁₇-Plaques signifikant. B) Die Anzahl an Gefäßen, die Aβ₈₋₁₇ bzw. pE3Aβ enthielten, unterschied sich in den drei Kategorien. Mittelgroße Hunde waren insgesamt häufiger von CAA betroffen als kleine und große Tiere.

Im ventralen Hippokampus von kleinen und mittelgroßen Hunden wurde eine erheblich größere Menge ($P < 0,01$) an pE3Aβ- als an Aβ₈₋₁₇-enthaltenden Plaques gefunden, Abb. 4.12 A. Bei kleinen Hunden betrug die Anzahl an pE3Aβ-Plaques 4,4/mm³ und an Aβ₈₋₁₇-Plaques 1,9/mm³. Mittelgroße Hunde wiesen 4,1/mm³ pE3Aβ- gegenüber 1,5/mm³ Aβ₈₋₁₇-enthaltende Plaques auf. Die Anzahl an Ablagerungen im ventralen Hippokampus war bei großen Hunden am geringsten und betrug 2,5/mm³ pE3Aβ- und 1,4/mm³ Aβ₈₋₁₇-Plaques. Zusätzlich besaßen kleine und mittelgroße Hunde quantitativ mehr pE3Aβ-Plaques als große Hunde mit $P < 0,01$.

Die Anzahl an gefäßassoziierten Ablagerungen im ventralen Hippokampus war relativ gering im Vergleich zu den anderen untersuchten Gehirnregionen, Abb. 4.12 B. Bei kleinen Hunden waren gefäßassoziierte Ablagerungen aus Aβ₈₋₁₇ mit 1,2/mm³ signifikant häufiger zu beobachten als jene, die aus pE3Aβ bestanden und eine Häufigkeit von 0,6/mm³ aufwiesen, $P < 0,05$. Auch bei Hunden der

Ergebnisse

Kategorien M und L waren $A\beta_{8-17}$ -enthaltende Ablagerungen häufiger in der Gefäßwand vorhanden ($1,5/\text{mm}^3$ bzw. $1,0/\text{mm}^3$) als solche aus pE3A β mit $1,1/\text{mm}^3$ bzw. $0,6/\text{mm}^3$.

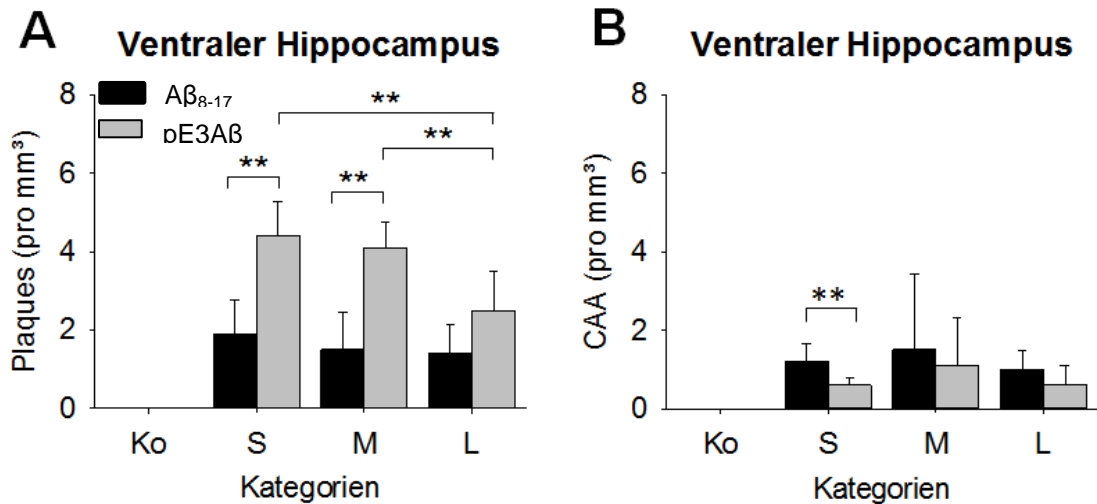


Abb. 4.12: Graphische Darstellung des mittleren Gehalts an $A\beta_{8-17}$ und pE3A β im ventralen Hippokampus

Mittels Immunhistologie markierte Plaques und gefäßassoziierte (CAA) Ablagerungen wurden stereologisch in den ventralen Hippokampi von kleinen (S), mittelgroßen (M) und großen (L) Hunden analysiert. Kontrolltiere (Ko) besaßen keine $A\beta$ -Ablagerungen im ventralen Hippokampus. A) Plaques des ventralen Hippokampus setzten sich hauptsächlich aus pE3A β zusammen. Bei Hunden der Kategorien S und M war der Unterschied zwischen dem vermehrten Auftreten von pE3A β - gegenüber $A\beta_{8-17}$ -Plaques signifikant. Zudem besaßen diese Hunde deutlich mehr pE3A β -enthaltende Plaques im ventralen Hippokampus als Tiere der Kategorie L. B) Die Gefäße im ventralen Hippokampus waren häufiger von $A\beta_{8-17}$ -Ablagerungen betroffen. Im Hippokampus der Kategorie S bildeten sich wesentlich mehr $A\beta_{8-17}$ -CAA als pE3A β -CAA.

Ein Vergleich der untersuchten Gehirnregionen zeigte, dass sich parenchymale pE3A β - und $A\beta_{8-17}$ -Ablagerungen mit zunehmendem Alter signifikant häufiger im frontalen und entorhinalen Kortex ablagerten, $P < 0,01$.

Analysiert wurde auch die Verteilung der $A\beta$ -Subtypen in den verschiedenen Gehirnregionen. Im frontalen Kortex lag eine mittlere positive Korrelation mit $r = 0,647$ ($P < 0,05$) zwischen $A\beta_{8-17}$ - und pE3A β -immunreaktiven Plaques vor, Abb. 4.13 A. Zudem bestand bei kleinen und mittelgroßen Hunden eine mittlere bis starke positive Korrelation mit $P < 0,05$ zwischen $A\beta_{8-17}$ -CAA und pE3A β -CAA im frontalen Kortex mit $r = 0,964$ und im entorhinalen Kortex mit $r = 0,646$, Abb. 4.13 B und C.

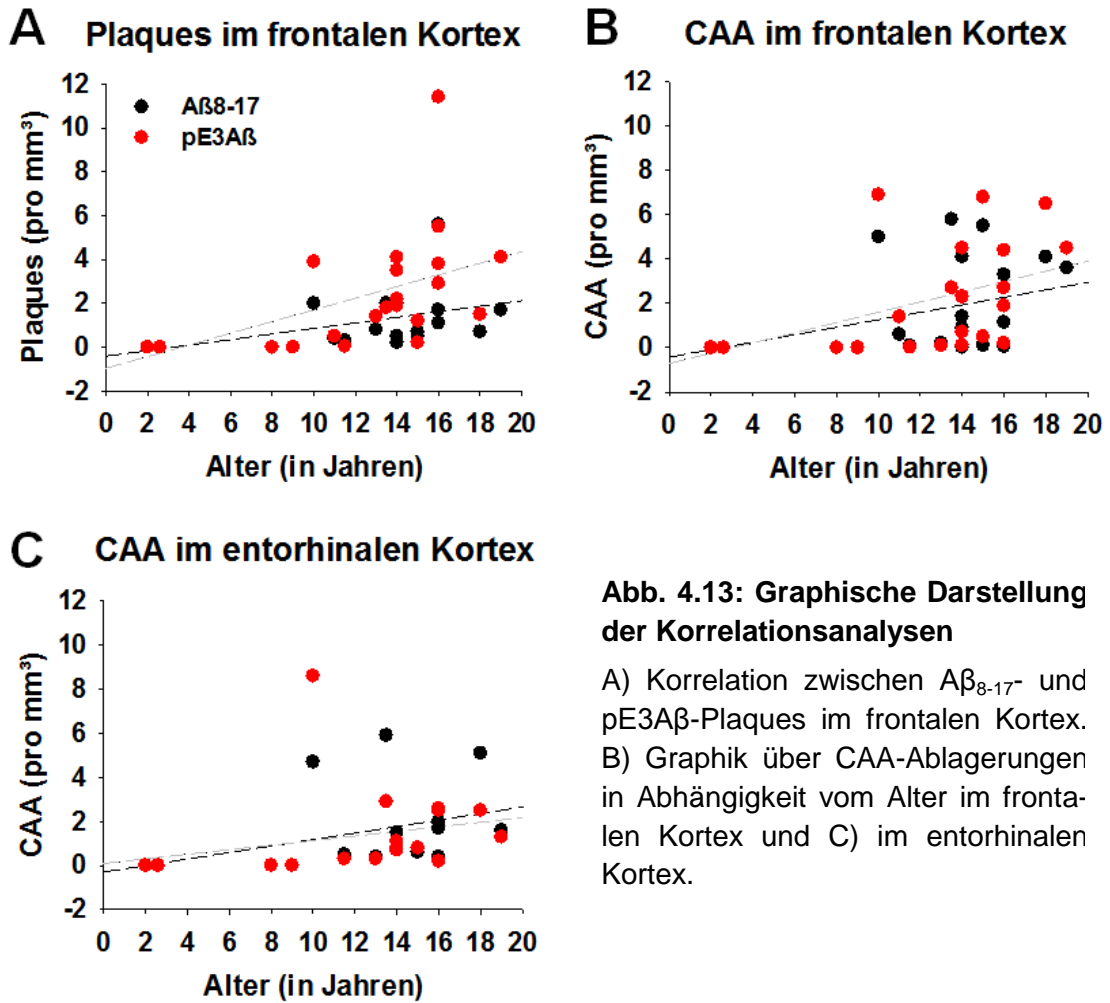


Abb. 4.13: Graphische Darstellung der Korrelationsanalysen

A) Korrelation zwischen $A\beta_{8-17}$ - und pE3A β -Plaques im frontalen Kortex. B) Graphik über CAA-Ablagerungen in Abhängigkeit vom Alter im frontalen Kortex und C) im entorhinalen Kortex.

4.4 Immunhistologische Darstellung von Tau-Pathologien

4.4.1 Kontrollgruppe

Untersucht wurden der frontale und entorhinale Kortex sowie die Hippokampusformation. Bei keinem Hund der Kontrollgruppe lag eine Markierung von Tau-Pathologien in den getesteten Gehirnregionen vor.

4.4.2 Alte Hunde der Versuchsgruppen

Tau-positive Strukturen wie NFTs, Neuropilfäden und neuritische Plaques wurden im Cornu ammonis der Hippokampusformation von drei Hunden im Alter von 13 und 15 Jahren (Fälle 11, 16 und 18) detektiert. NFTs waren 10 bis 25 μm groß, hatten eine gewundene, teilweise flammenförmige Form und waren

Ergebnisse

hauptsächlich im Stratum pyramidale des Cornu ammonis lokalisiert. Neuropilfäden bestanden aus fragmentierten und verdrillten Filamenten, die kleiner als 50 μm waren und in den Strata radiatum und lacunosum-moleculare vorlagen. Diffuse neuritische Plaques setzten sich aus aggregierten helikalen Strukturen zusammen. Die Tau-Pathologien zeigten sich mit unterschiedlichem Schweregrad im Hippokampus der drei Tiere. Ein 15 Jahre alter Pekinese (Fall 16) besaß eine hochgradige Pathologie mit Formation von NFTs, Neuropilfäden und neuritischen Plaques im Cornu ammonis des dorsalen Hippokampus. Im ventralen Hippokampus wurde intraneuronales, hyperphosphoryliertes Tau in den Pyramidenzellen beobachtet, Abb. 4.14.

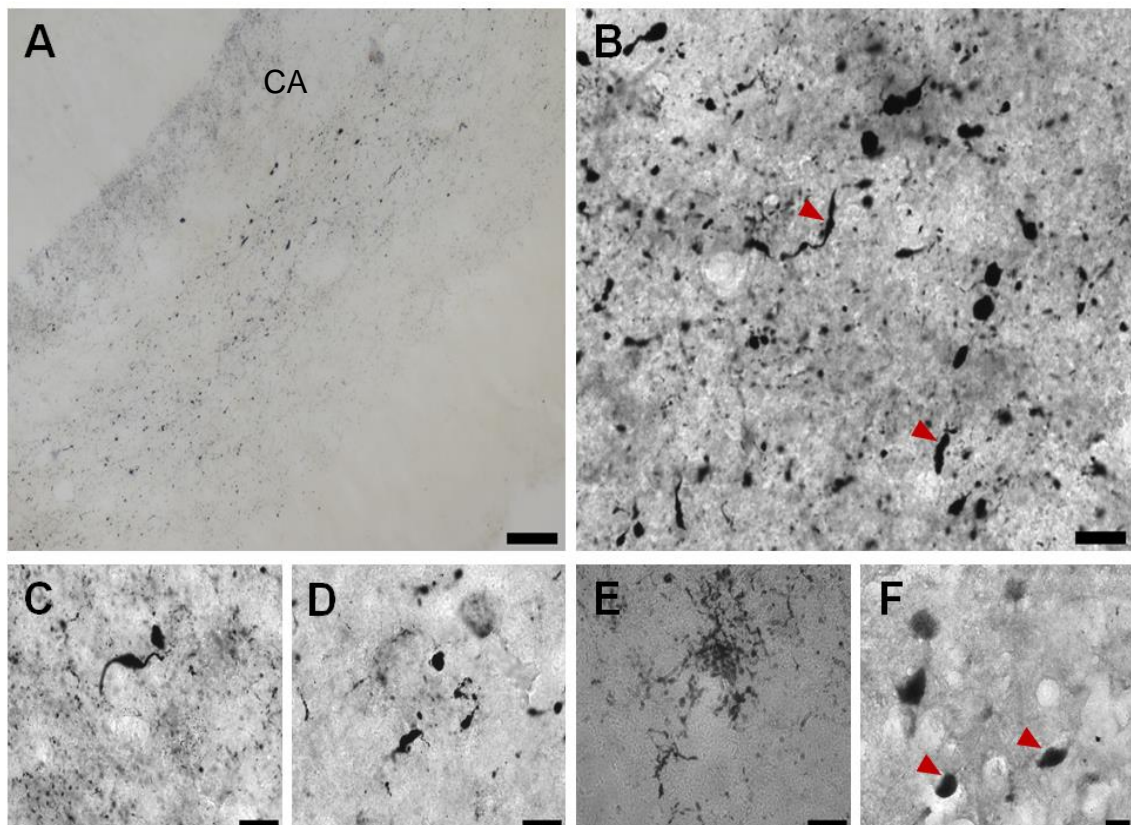


Abb. 4.14: Hyperphosphoryliertes Tau im Fall 16, gefärbt mittels ABC-Methode unter Verwendung des Antikörpers AT8

A) Tau-positive Strukturen lagen im Cornu ammonis (CA) des dorsalen Hippokampus vor. B) Pyramidenzellen mit hochgradigem Befall an NFTs (Pfeilspitzen). C) Die flammenförmige Gestalt ist charakteristisch für NFTs. D) Runde bis flammenförmige NFTs. E) Neuritischer Plaque im dorsalen Hippokampus. F) Im ventralen Hippokampus lagen tau-positive Pyramidenzellen vor (Pfeilspitzen). Maßstabsbalken: 100 μm (A, B, F); 20 μm (C, D, E).

Ergebnisse

Bei zwei großen und mittelgroßen Hunden (Fälle 11 bzw. 18) lagen Tauablagerungen in den Pyramidenzellen des ventralen und dorsalen Hippokampus vor, Abb. 4.15. Als Zeichen einer progressiven Degeneration der Pyramidenzellen waren die Dendriten retrahiert und wulstig, die Perikarya waren teilweise kavernös und geschwollen, Abb. 4.15 C und D. Die Axone waren ebenfalls tau-positiv, allerdings war die Pathologie noch nicht soweit fortgeschritten, dass sich Neuropilfäden bilden konnten, Abb. 4.15 E.

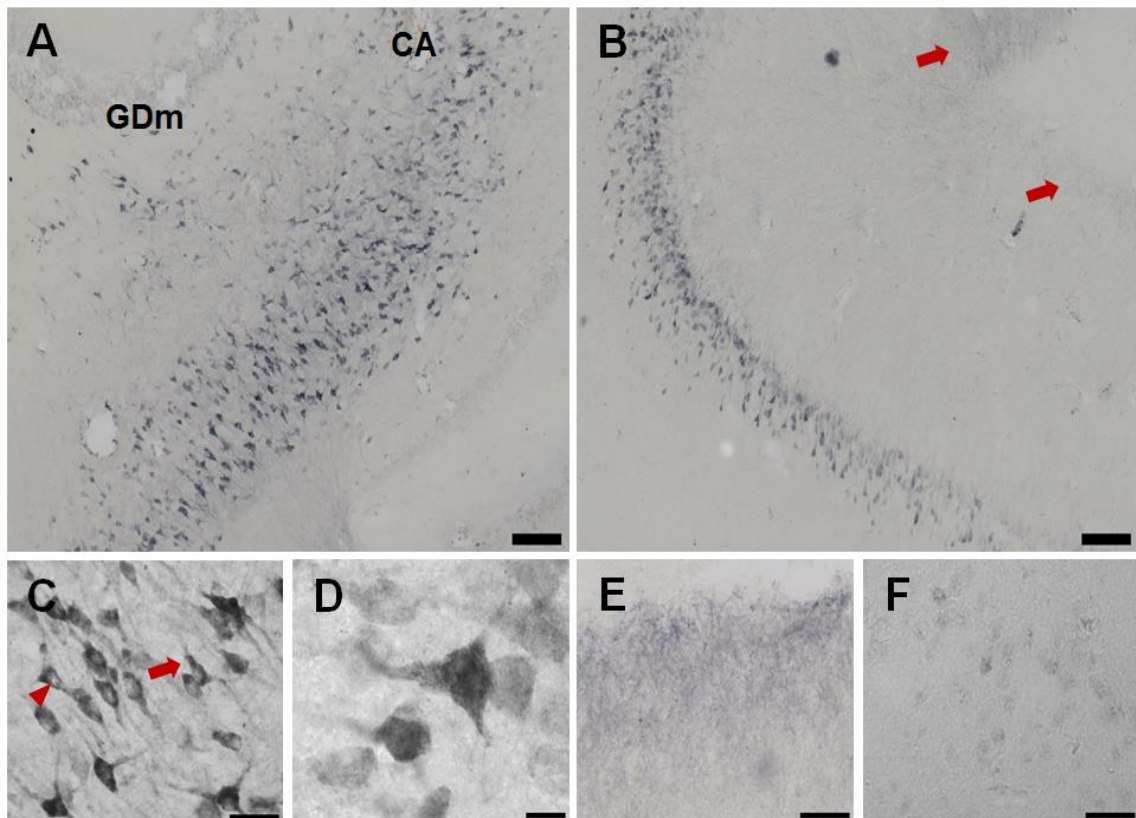


Abb. 4.15: Darstellung des Tauproteins mit dem Antikörper AT8

A) NFTs in den Pyramidenzellen des Cornu ammonis (CA) eines 15 Jahre alten Mischlingshundes (Fall 18). B) Die Pyramidenzellen besaßen tau-positive Dendriten (Pfeile). C) Pyramidenzellen mit NFTs wiesen kavernöse Somata (Pfeilspitze) und einen wulstigen Colliculus axonis (Pfeil) auf, Fall 18. D) Darstellung einer degenerativ veränderten Pyramidenzelle von Fall 18. E) Vergrößerung tau-positiver Axone der Pyramidenzellen von Fall 18. F) NFTs im Cornu ammonis eines 13 Jahre alten großen Hundes, Fall 11. Maßstabsbalken: 200 μm (A, B); 50 μm (C, E, F); 20 μm (D).

In den anderen untersuchten Gehirnregionen der alten Hunde wurden keine hyperphosphorylierten und aggregierten Tauproteine nachgewiesen, Abb. 4.16.

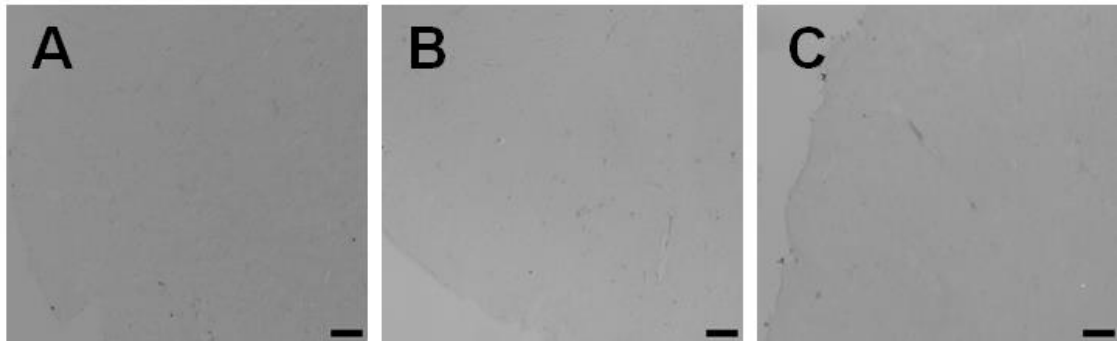


Abb. 4.16: Frontaler Kortex gefärbt mit dem Antikörper AT8 zur Darstellung des hyperphosphorylierten Tauproteins

Der frontale Kortex von A) Fall 16, B) Fall 18 und C) Fall 11 war frei von tau-positiven Strukturen. Maßstabsbalken: 200 μ m.

4.5 Charakterisierung und Quantifizierung der Mikroglia

4.5.1 Darstellung der Mikroglia

4.5.1.1 Kontrollgruppe

In den Gehirnen der Kontrolltiere wurde die Mikroglia immunhistologisch mittels des Antikörpers Kaninchen-anti-Iba1 im frontalen Kortex und im Hippokampus sowie im entorhinalen Kortex dargestellt.

Die Mikroglia war regelmäßig in der grauen und weißen Substanz verteilt, Abb. 4.17 A. In der grauen Substanz waren die Somata der Mikroglia kugelförmig bis ellipsoid und besaßen lange, schmale, sich in alle Richtungen des Parenchyms verzweigende Fortsätze. Durch ihre Verzweigungen bildeten die Fortsätze der Mikroglia ein Netz, in welches die Somata eingebettet waren, Abb. 4.17 B. In der weißen Substanz besaß die Mikroglia einen ellipsoiden Zellkörper. Ihre Fortsätze verliefen parallel zu den Axonen. Mikroglia in der weißen Substanz lagen dichter als jene in der grauen Substanz.

Im Gyrus dentatus waren zahlreiche Mikroglia im Bereich des Hilus und im Stratum moleculare lokalisiert. Weniger dicht lagen die Mikroglia im Stratum granulare. Im Cornu ammonis fand sich eine hohe Dichte an Mikroglia in den Strata oriens und pyramidale. Weniger Mikroglia wurden im Stratum lacunosum-moleculare markiert, Abb. 4.17 C. Die Morphologie der Mikroglia war einheitlich. Sie besaßen rundliche Somata mit langen, schmalen, sich oft verzweigenden Fortsätzen, Abb. 4.17 D.

Ergebnisse

Im entorhinalen Kortex lagen ramifizierte Mikroglia mit einer regelmäßigen Verteilung vor, Abb. 4.17 E und F.

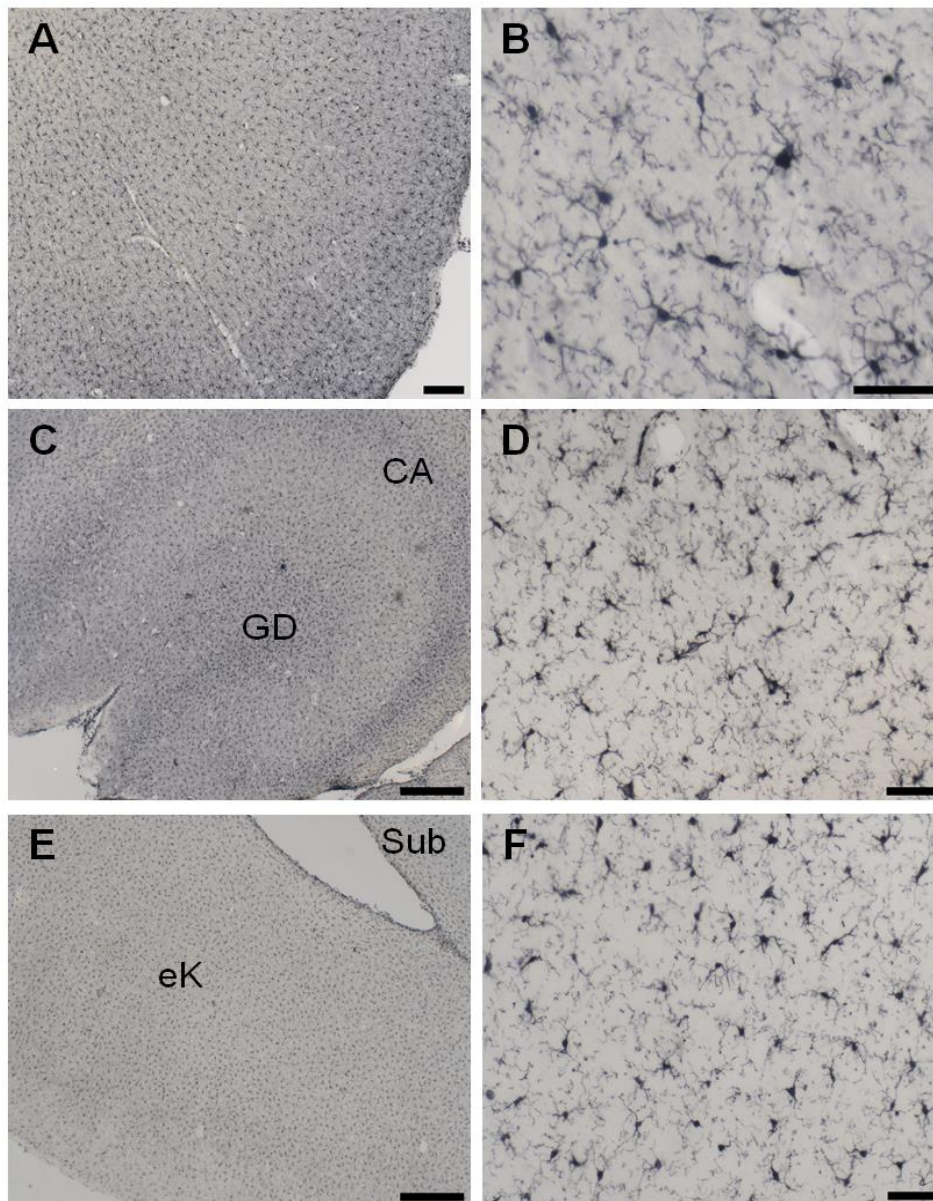


Abb. 4.17: Morphologie der Mikroglia in den Gehirnregionen der Kontrollgruppe

Dargestellt wurden die Mikroglia mit der ABC-Methode unter Verwendung des Antikörpers gegen Iba1. A) Regelmäßige Verteilung der Mikroglia im frontalen Kortex von Fall 1. B) Vergrößerte Darstellung der ramifizierten Mikroglia. C) Bereiche mit hoher Zelldichte im Gyrus dentatus (GD) und Cornu ammonis (CA) eines 2 Jahre alten Beagles (Fall 3). D) Ramifizierte Mikroglia im Cornu ammonis von Fall 2. E) Verteilung der Zellen im Subiculum (Sub) und im entorhinalen Kortex (eK) von Fall 5. F) Vergrößerte Ansicht der ramifizierten Mikroglia von Fall 5. Maßstabsbalken: 200 μm (A), 50 μm (B), 600 μm (C, E), 60 μm (D, F).

4.5.1.2 Alte Hunde der Versuchsgruppen

In den untersuchten Gehirnregionen der alten Hunde (Fälle 6 - 24) erfolgten die Darstellung und die Untersuchung der Mikroglia mit dem Antikörper Kaninchen-anti-Iba1. Morphologisch unterschieden sich die Mikroglia der alten Hunde untereinander und im Vergleich mit der Mikroglia der Kontrolltiere.

Im frontalen Kortex zweier Hunde ohne (Fall 6) beziehungsweise mit geringgradiger A β -Pathologie (Fall 7) waren die Mikroglia ramifiziert und besaßen kleine, kugelige Zellkörper mit oft verzweigten Fortsätzen.

In der Hippokampusformation ähnelte die mikrogliale Verteilung und Morphologie dieser Hunde jener der Kontrollgruppe. Die kleinen Zellkörper besaßen lange, schmale Zellfortsätze, die sich oft verzweigten und ein dichtes Geflecht bildeten. Diese Morphologie entsprach der ramifizierten Mikroglia. Im Stratum oriens und Stratum moleculare des Cornu ammonis sowie im Hilus des Gyrus dentatus waren die Zellen dichter angeordnet.

Auch im entorhinalen Kortex dieser Hunde traten ramifizierte Mikroglia in regelmäßiger Verteilung auf.

Drei Hunde mit Tau-Pathologie im Hippokampus und wenigen A β -Ablagerungen (Fälle 11, 16 und 18) wiesen Veränderungen der mikroglialen Morphologie in den untersuchten Gehirnregionen auf. Mikroglia des frontalen Kortex dieser Hunde waren ungleichmäßig verteilt, verglichen mit der Mikroglia der Kontrollgruppe. Neben ramifizierten Zellen traten Mikroglia mit dystrophischen Veränderungen auf. Aus den kugeligen, intensiv gefärbten Zellkörpern traten kurze, dicke Fortsätze aus. Ein dichtes Netz der mikroglialen Fortsätze wurde nicht beobachtet. Einige Fortsätze wiesen perlenschnurartige und bulböse Auftreibungen auf. Zusätzlich fanden sich häufig Aggregate aus fusionierten Mikroglia (Abb. 4.18).

Im Stratum pyramidale besaßen die Mikroglia kugelförmige bis ellipsoide Zellkörper, aus denen kurze, schmale Fortsätze austraten. Einige Mikroglia des Cornu ammonis waren dystrophisch verändert mit perlenschnurartigen und bulbösen Auftreibungen an den Fortsätzen (Abb. 4.18). Im Gyrus dentatus dagegen, wo diffuse A β -Ablagerungen im Stratum moleculare vorlagen und keine Tau-Pathologien bestanden, hatten die Mikroglia eine ramifizierte Mor-

Ergebnisse

phologie. Auch im entorhinalen Kortex lagen trotz A β -Pathologie überwiegend ramifizierte Mikroglia vor. Vereinzelt fanden sich Aggregate aus fusionierten Mikroglia und Mikroglia mit dystrophischen Merkmalen.

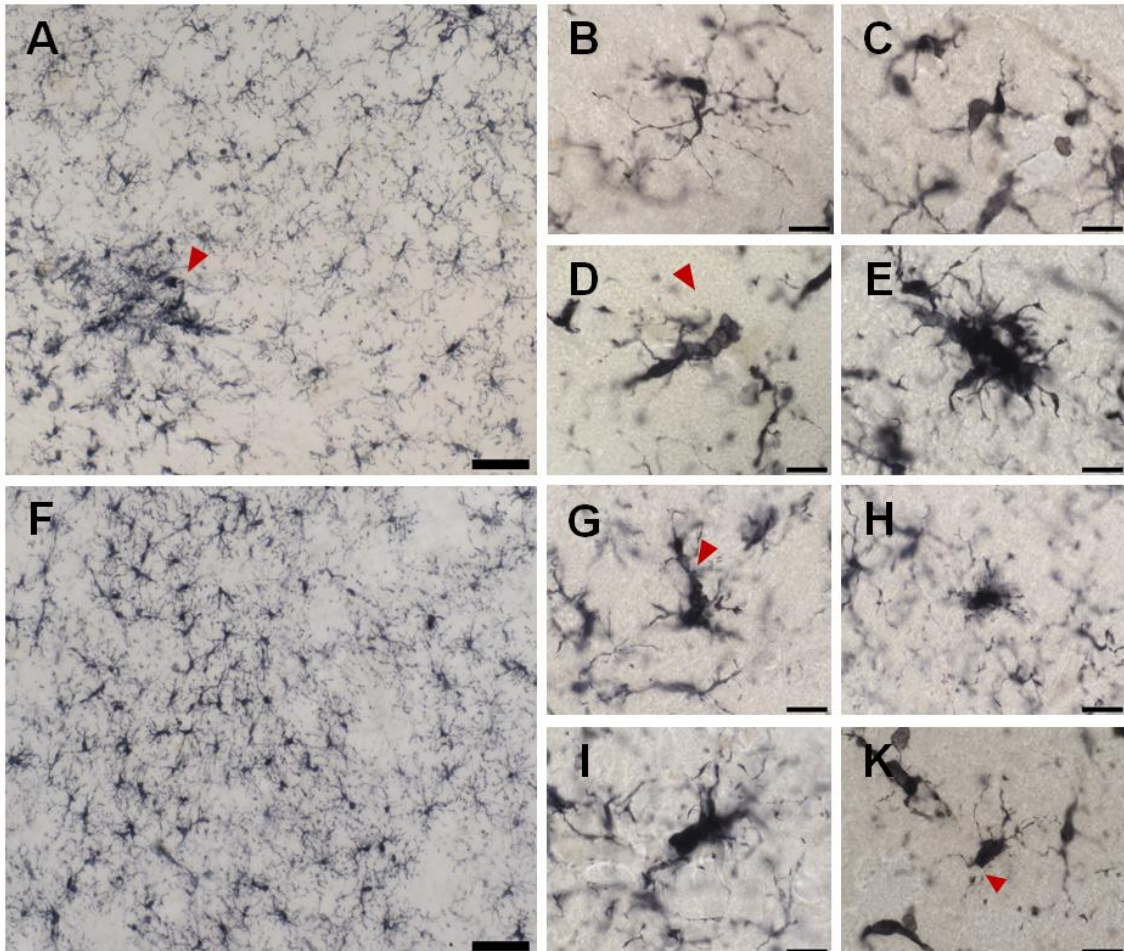


Abb. 4.18: Morphologie Iba1-positiver Mikroglia bei Hunden mit Tau-Pathologie

A) Koagula aus Mikroglia (Pfeilspitze) im Cornu ammonis eines 15 Jahre alten Hundes (Fall 16). B) Ramifizierte Mikroglia im frontalen Kortex von Fall 16. C) Dystrophische Mikroglia mit bulbösen Auftreibungen im frontalen Kortex desselben Hundes. D) Mikroglia mit abnormer Schwellung der Zellkörper (Pfeilspitze) im Fall 16. E) Aktivierte Mikroglia im Cornu ammonis von Fall 16. F) Verteilung der Mikroglia im Cornu ammonis eines 15 Jahre alten Mischlingshundes (Fall 18). G) Mikroglia mit perlenschnurartigen Auftreibungen eines Fortsatzes (Pfeilspitze) im Stratum lacunosum-moleculare (Fall 18). H) Aktivierte Mikroglia in derselben Region (Fall 18). I) Koagula aus Mikroglia im Stratum oriens (Fall 18). K) Dystrophische Mikroglia mit fragmentierten Fortsätzen (Pfeilspitze) im frontalen Kortex eines 13 Jahre alten Hundes (Fall 11). Maßstabsbalken: 60 μ m (A, F); 20 μ m (B - E, G - K).

Die immunfluoreszente, mikroskopische Doppelfärbung der Mikroglia und des Tauproteins veranschaulichte die lokale Beziehung zwischen tau-positiven

Ergebnisse

Pyramidenzellen des Cornu ammonis und benachbarter Mikroglia. Nur wenige Fortsätze der Mikroglia waren direkt mit dem hyperphosphorylierten Tau der Pyramidenzellen assoziiert. In keiner Mikroglia konnte Tauprotein nachgewiesen werden. Allerdings zeigten Mikroglia im Cornu ammonis morphologische Veränderungen wie Koagula und dystrophische Merkmale (Abb. 4.19).

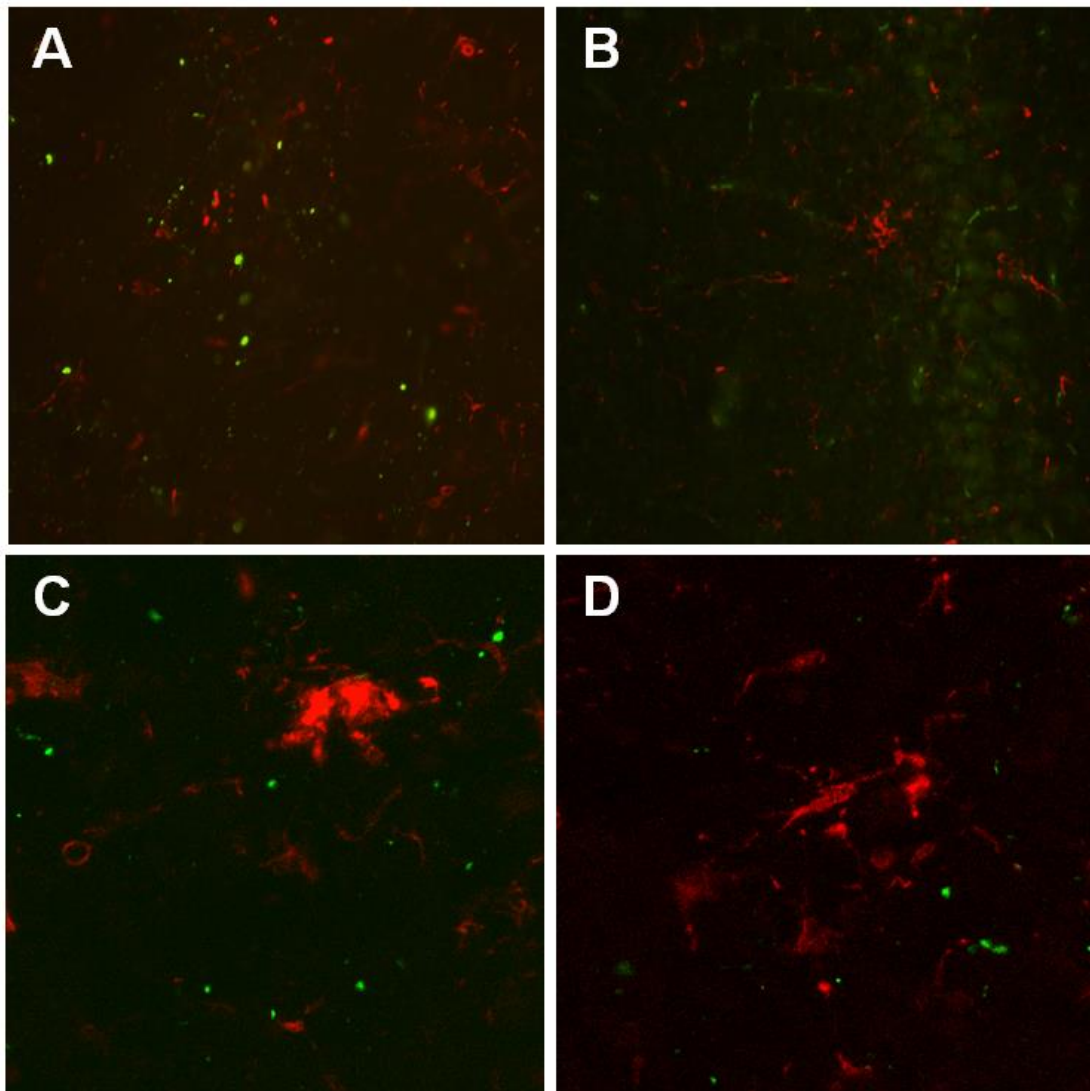


Abb. 4.19: Doppelmarkierung von Mikroglia und hyperphosphoryliertem Tauprotein mittels Immunfluoreszenz

A) Räumliche Ausdehnung des Tauproteins (AT8, grün) und assoziierter Mikroglia (Iba1, rot) im Stratum pyramidale eines 15 Jahre alten Hundes (Fall 16). B) Schwach tau-positive Pyramidenzellen mit assoziierten aktivierten Mikroglia im Cornu ammonis von Fall 11. C) Immunopositive Zellkoagulate, umgeben von hyperphosphoryliertem Tauprotein (Fall 16). D) Mikroglia mit dystrophischen Merkmalen fanden sich häufig in unmittelbarer Nähe zu hyperphosphoryliertem Tauprotein (Fall 16). 20fache Vergrößerung.

Ergebnisse

Im frontalen Kortex von Hunden mit Satou-Stadium 1 und 2 ohne Tau-Pathologie (Fälle 9, 15, 22 und 23) waren die Mikroglia ungleichmäßig verteilt. Diese Zellen hatten kleine, kugelige bis ovale Zellkörper und lange, schmale Fortsätze mit feinen Verzweigungen (Abb. 4.20). Bei einem Hund mit hochgradiger CAA (Fall 23) waren verhältnismäßig viele Mikroglia im aktivierten Stadium sichtbar.

Im Cornu ammonis, wo diffuse Plaques im Stratum moleculare vorlagen, besaßen aktivierte Mikroglia einen kugeligen bis ellipsoidförmigen, kräftig gefärbten Zellkörper mit dicken, kurzen Fortsätzen. Koagula aus fusionierten Zellen wurden vereinzelt beobachtet. Zusätzlich zu den aktivierten Mikroglia lagen ramifizierte Mikroglia vor. Diese waren gekennzeichnet durch eine weniger intensive Färbung des kugeligen Zellkörpers und den langen, sich oft verzweigenden Fortsätzen.

Im entorhinalen Kortex wurden trotz vorhandener A β -Pathologie überwiegend ramifizierte Mikroglia nachgewiesen.

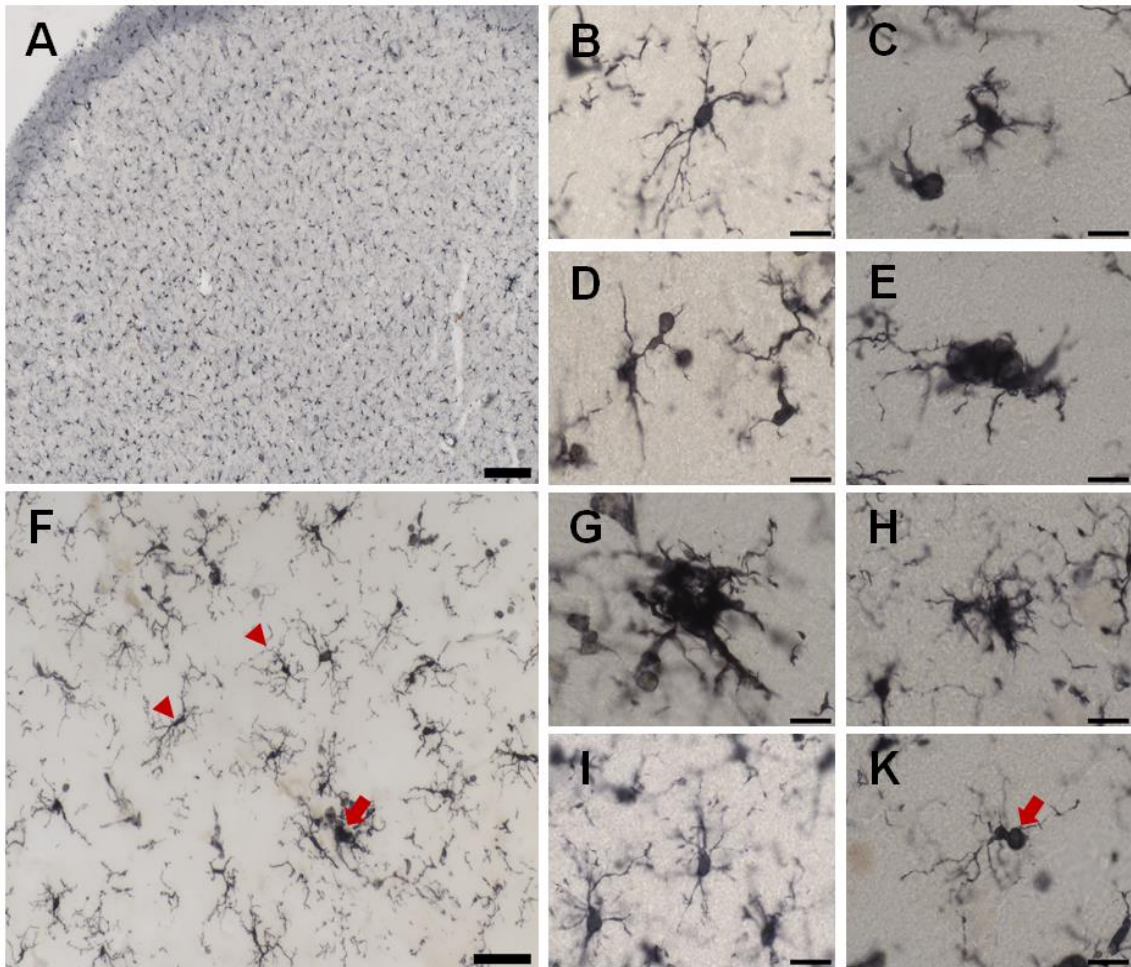


Abb. 4.20: Morphologie Iba1-immunopositiver Mikroglia bei den Satou-Stadien 1 und 2

A) Verteilung der Mikroglia im frontalen Kortex eines 14 Jahre alten Hundes (Fall 15). B) Ramifizierte Mikroglia im frontalen Kortex von Fall 15. C) Fall 23 wies viele aktivierte Mikroglia in der gleichen Region auf. D) Auch dystrophische Zellen mit bulbösen Auftreibungen konnten im frontalen Kortex von Fall 23 beobachtet werden. E) Koagula aus mehreren aktivierten Mikroglia im frontalen Kortex von Fall 16. F) Im entorhinalen Kortex von Fall 22 lagen vorwiegend ramifizierte Mikroglia (Pfeilspitzen) und wenige aktivierte Zellen (Pfeil) vor. G) Koagula aus aktivierten Mikroglia fanden sich im Cornu ammonis von Fall 22. H) Ein 18 Jahre alter Mischlingshund (Fall 16) mit aktivierten Mikroglia im Stratum lacunosum-moleculare. I) Bei Fall 15 fanden sich ramifizierte Mikroglia in der gleichen Region. K) Einige Zellen des Cornu ammonis von Fall 23 wiesen dystrophische Merkmale wie die Schwellung der Somata (Pfeil) auf. Maßstabsbalken: 200 μm (A); 60 μm (F); 20 μm (B - E, G - K).

Hunde mit dem Satou-Stadium 3 im frontalen Kortex und fehlender Tau-Pathologie (Fälle 8, 12, 13, 14, 20 und 24) besaßen irregulär verteilte Mikroglia in der grauen Substanz. Die intensiv gefärbten Zellkörper waren kugelförmig bis ellipsoid und hatten relativ kurze Fortsätze mit wenigen feinen Verzweigungen.

Ergebnisse

Einige Fortsätze waren verdickt oder besaßen perlenschnurartige Auftreibungen (Abb. 4.21).

Mikroglia des Gyrus dentatus und Cornu ammonis besaßen einen kugeligen Zellkörper mit schmalen, sich oft verzweigenden Fortsätzen. Zusätzlich lagen auch fusionierte Zellen und aktivierte Mikroglia vor. Letztere besaßen große, runde Zellkörper mit verdickten, kurzen Fortsätzen ohne feinen Verzweigungen. Bei einem Hund im Alter von 19 Jahren (Fall 24) wurden dystrophische Mikroglia mit verdickten Fortsätzen und bulbösen Auftreibungen detektiert (Abb. 4.21).

Der entorhinale Kortex wies eine ausgeprägte A β -Pathologie auf. Dennoch waren neben aktivierten auch ramifizierte Mikroglia zu beobachten (Abb. 4.21).

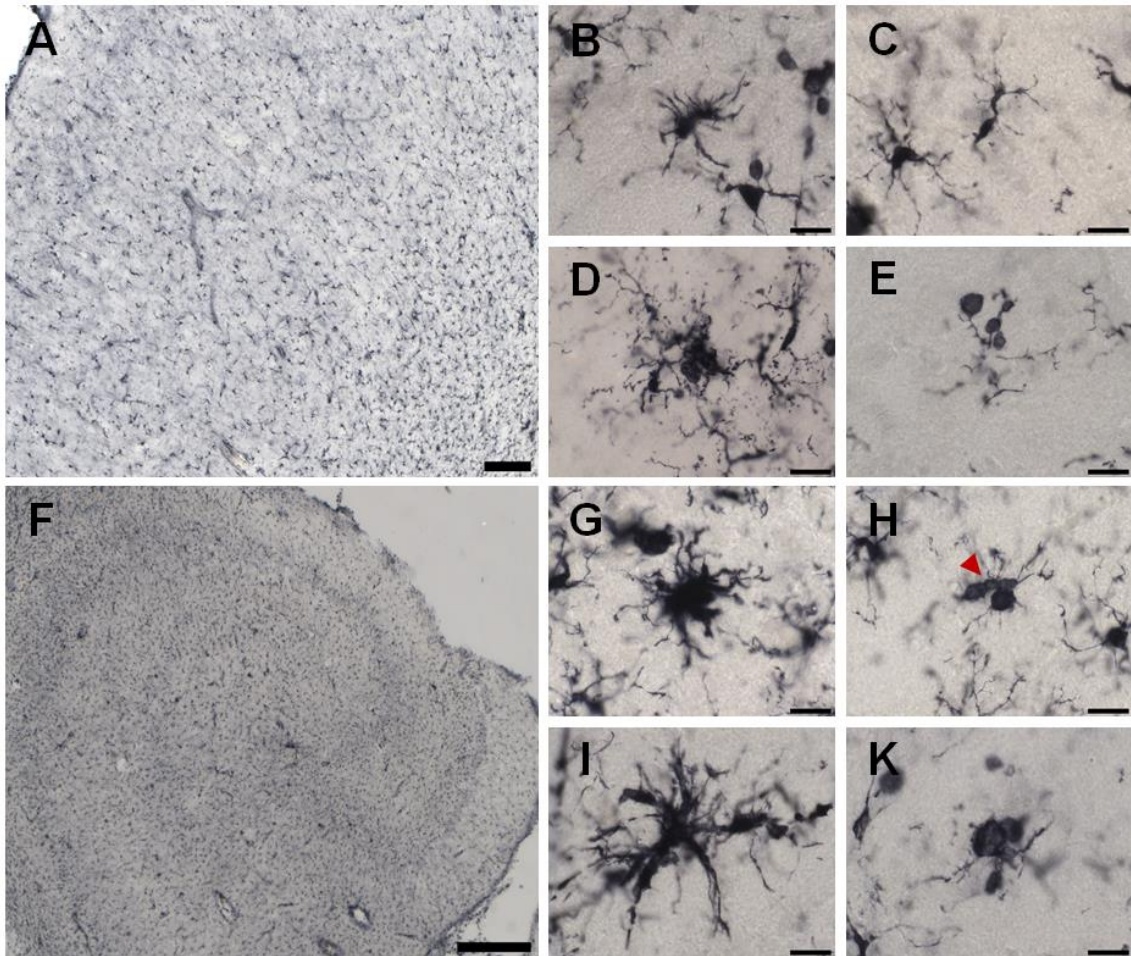


Abb. 4.21: Morphologie Iba1-immunopositiver Mikroglia beim Satou-Stadium 3

A) Ungleichmäßige Verteilung der Zellen im frontalen Kortex von Fall 8. B) Aktivierte Mikroglia in der gleichen Region (Fall 8). C) Ein 13,5 Jahre alter Hund (Fall 12) wies fusionierte Mikroglia im frontalen Kortex auf. D) Koagula aus aktivierten Mikroglia fanden sich im frontalen Kortex von Fall 8. E) Degenerierte Mikroglia im frontalen Kortex eines 19 Jahre alten Hundes (Fall 24). F) Verteilung der immunopositiven Mikroglia im Hippokampus (Fall 8). G) Aktivierte Mikroglia lagen im Gyrus dentatus vor (Fall 12). H) Dystrophische Mikroglia mit perlenschnurartigen Auftreibungen eines Fortsatzes (Pfeil) im Stratum lacunosum-moleculare (Fall 12). I) Aktivierte Mikroglia im entorhinalen Kortex (Fall 14). K) Degenerierte Mikroglia im entorhinalen Kortex (Fall 20). Maßstabsbalken: 200 μm (A); 600 μm (B), 20 μm (B - E, G - K).

Mikroglia des frontalen Kortex von Tieren mit dem Satou-Stadium 4 (Fälle 10, 17, 19 und 21) waren häufig im aktivierten Stadium. Einige Mikroglia wiesen dystrophische Merkmale wie fragmentierte Zellausläufer oder bulböse Auftreibungen auf (Abb. 4.22). Daneben fanden sich ramifizierte Zellen mit langen, schmalen Zellausläufern und feinen Verzweigungen.

Ergebnisse

Im Hippokampus wurden neben ramifizierten Mikroglia auch solche mit einer aktivierten Morphologie dokumentiert.

Auch im entorhinalen Kortex wurden aktivierte Mikroglia markiert. Vereinzelt lagen sie als Koagula aus mehreren, intensiv gefärbten Zellen mit dicken, kurzen Fortsätzen vor (Abb. 4.22). Zusätzlich fanden sich an einigen Mikroglia dystrophisch veränderte Zellausläufer.

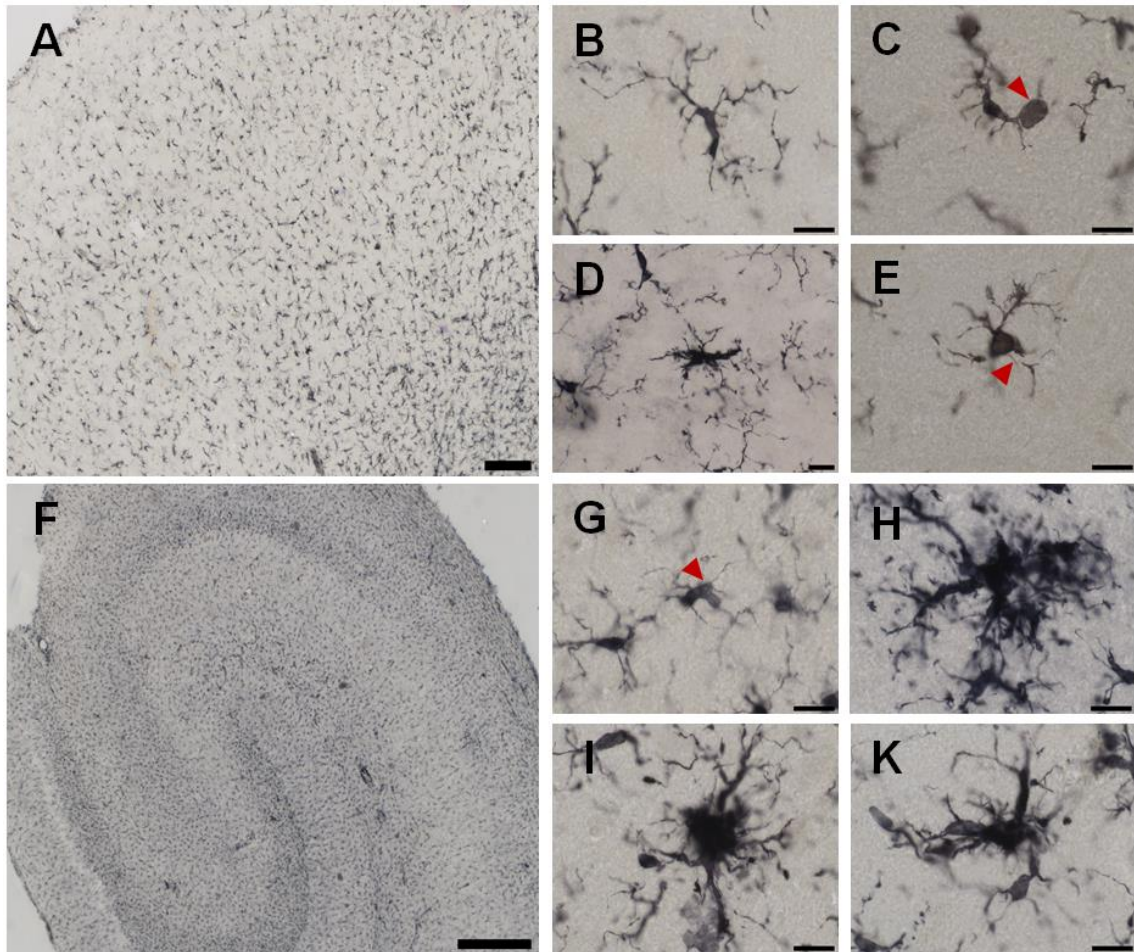


Abb. 4.22: Morphologie Iba1-immunopositiver Mikroglia beim Satou-Stadium 4

A) Verteilung der Mikroglia im frontalen Kortex von Fall 19. B) Ramifizierte Mikroglia im frontalen Kortex von Fall 17. C) Dystrophische Mikroglia mit bulböser Auftreibung in einem Fortsatz (Pfeilspitze) im frontalen Kortex von Fall 19. D) Aktivierte Mikroglia in der gleichen Region von Fall 21. E) Mikroglia mit fragmentierten Fortsätzen (Pfeilspitze) (frontaler Kortex, Fall 19). F) Übersicht über die Verteilung der Mikroglia im Hippokampus eines 11,5 Jahre alten Hundes (Fall 10). G) Dystrophische Mikroglia mit bulbösen Auftreibungen an den Fortsätzen (Pfeilspitze) im Stratum lacunosum-moleculare von Fall 17. H) Fall 19 mit Koagula aus Mikroglia im Gyrus dentatus. I) Aktivierte Mikroglia im entorhinalen Kortex (Fall 10). K) Koagula aus aktivierten Mikroglia in der gleichen Region (Fall 10). Maßstabsbalken: 200 μm (A); 600 μm (F); 50 μm (D); 20 μm (B, C, E, G - K).

4.5.2 Assoziation der mikroglialen Morphologie zu den Größen- und Gewichtskategorien der untersuchten Hunde

Aktivierte Mikroglia lagen bei kleinen, mittelgroßen und großen Hunden vor. Bei einigen alten Hunden der drei Kategorien wurden Merkmale von Dystrophie detektiert.

4.5.3 Auswertung morphologischer Parameter mit dem Filament Tracer

Die Morphologie der Mikroglia des Gyrus postcruciatatus stellte sich in Abhängigkeit von der Neuropathologie dieses Hirnareals unterschiedlich dar. So waren die Fortsätze der Mikroglia von Hunden mit Tau-Pathologie (\uparrow Tau) kürzer und hatten den geringsten Durchmesser (Abb. 4.23 A). Durchschnittlich besaßen die Zellausläufer 3,8 (Fälle 11, 16, 18) bis 10 Verzweigungen (Fälle 2, 5, 8, 10, P23). Bei Tieren mit Tau-Pathologie nahmen Mikroglia mit $384,9 \mu\text{m}^2$ deutlich weniger Fläche ein im Vergleich zu Hunden mit hochgradigen A β -Ablagerungen (\uparrow A β , $843,3 \mu\text{m}^2$) und zur Kontrollgruppe (Ko, $719,7 \mu\text{m}^2$).

Ergebnisse

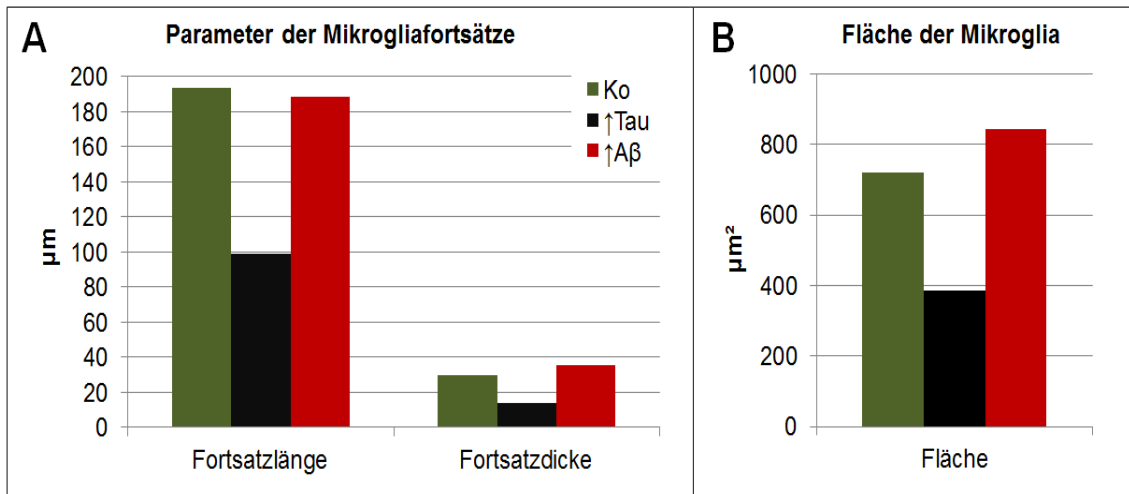


Abb. 4.23: Parameter der Mikroglia des Gyrus postcruciatu

Mit dem Filament Tracer wurden morphologische Parameter der Mikroglia der Kontrollgruppe (Ko) mit denen von Tieren mit hochgradiger Tau- bzw. Aβ-Pathologie (↑Tau bzw. ↑Aβ) verglichen. A) Zwischen der Kontrollgruppe ohne Neuropathologie und Hunden mit einer Neuropathologie bestanden Unterschiede hinsichtlich der Länge und Dicke der Fortsätze. Diese waren bei Tieren mit Tau deutlich verringert. Hunde mit hochgradigen Aβ-Ablagerungen zeigten ähnliche Werte wie die Kontrollgruppe. B) Die durchschnittliche Fläche, welche Mikroglia im Parenchym abdeckten, war bei Aβ-Hunden am stärksten ausgeprägt.

Mikroglia des Cornu ammonis der jungen und alten Hunde hatten deutlich hypertrophierte Fortsätze im Gegensatz zu den Mikroglia im frontalen Kortex. Mikroglia der Kontrollgruppe dominierten in den Parametern zur Länge und Dicke der Fortsätze gegenüber Hunden mit Tau- und Aβ-Pathologie, Abb. 4.24 A. Die Fläche der Mikroglia betrug 932,6 µm² bei der Kontrollgruppe und 885,7 µm² bei Hunden mit Tau-Pathologie. Die größte Ausdehnung mit 988,4 µm² besaßen Mikroglia der Hunde mit hochgradiger Aβ-Pathologie, Abb. 4.24 B.

Ergebnisse

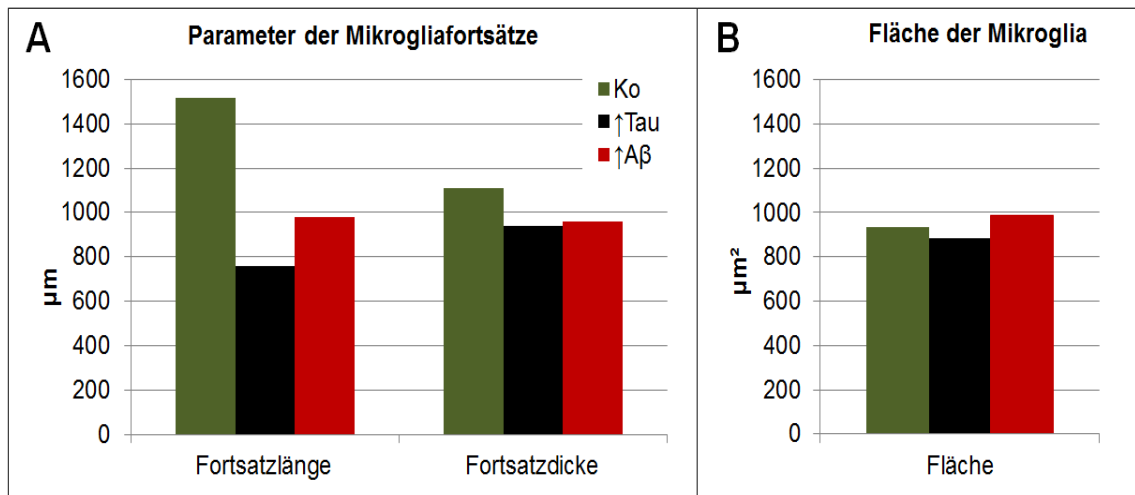


Abb. 4.24: Parameter der Mikroglia des Cornu ammonis

Mit dem Filament Tracer wurden morphologische Parameter der Mikroglia der Kontrollgruppe (Ko) mit denen von Tieren mit hochgradiger Tau- bzw. Aβ-Pathologie (↑Tau bzw. ↑Aβ) verglichen. A) Darstellung der unterschiedlichen Länge und Dicke der mikroglialen Fortsätze im Cornu ammonis der Kontrollgruppe (Ko) und bei Tieren mit Neuropathologie (↑ Tau bzw. ↑ Aβ). Mikroglia der Kontrollgruppe besaßen längere und dickere Fortsätze gegenüber alten Hunden mit Tau- bzw. Aβ-Ablagerungen. B) Mikroglia in den Gehirnen der Hunde mit Aβ nahmen mehr Fläche ein als jene in den Gehirnen der Kontrollgruppe und von Hunden mit Tau-Pathologie.

4.5.4 Quantifizierung der Mikroglia

4.5.4.1 Untersuchung der Anzahl der Mikroglia in Assoziation zur Neuropathologie

Es wurde eine Analyse nach möglichen funktionellen Zusammenhängen zwischen dem Satou-Stadium und einer gegebenenfalls vorhandenen Tau-Pathologie mit der Anzahl an Mikroglia in den untersuchten Gehirnregionen durchgeführt. Im Gyrus postcruciatatus sowie im entorhinalen Kortex bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit den Satou-Stadien 1 bis 4 und der Kontrollgruppe, Abb. 4.25. Allerdings konnten insbesondere im frontalen Kortex von Hunden mit den Satou-Stadien 2 und 4 mit 15.447 Mikroglia/mm³ bis 16.351 Mikroglia/mm³ vermehrt Mikroglia beobachtet werden. Im Vergleich dazu betrug die mittlere Anzahl an Mikroglia in der Kontrollgruppe ohne Neuropathologie (Fälle 1 - 5) und Tieren mit dem Satou-Stadium 1 und Tau-Pathologie im Hippokampus ca. 12.300 Mikroglia/mm³ (Abb. 4.25 A).

Ergebnisse

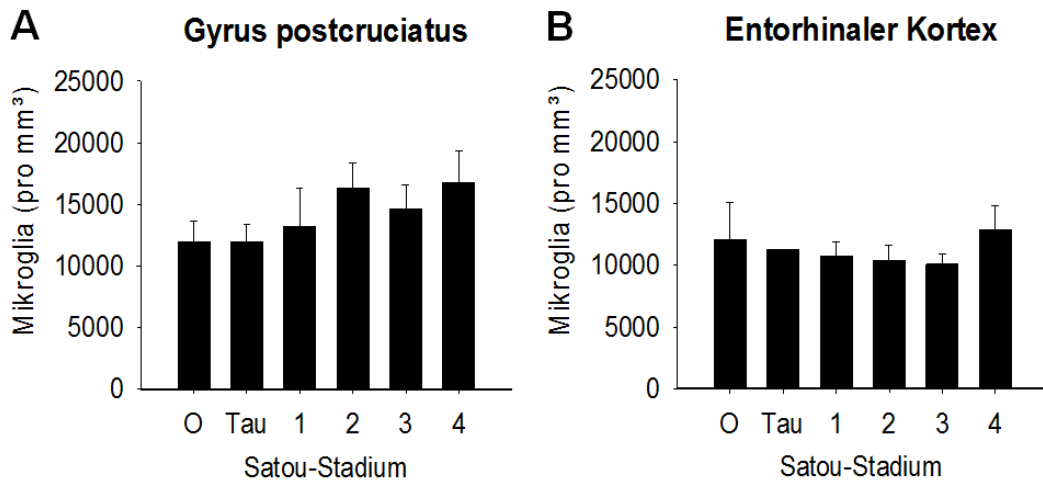


Abb. 4.25: Anzahl an Mikroglia im Gyrus postcruciatatus und im entorhinalen Kortex in Abhängigkeit vom Satou-Stadium

Die Quantifizierung der immunopositiven Mikroglia erfolgte stereologisch mit dem Optical Fractionator bei Hunden ohne Neuropathologie (Satou-Stadium 0) und mit hochgradigen Tau- bzw. A β -Ablagerungen. Der Schweregrad an A β -Plaques bestimmte das Satou-Stadium. A) Hunde mit den Satou-Stadien 2 bis 4 besaßen eine höhere Anzahl an Mikroglia im Gyrus postcruciatatus gegenüber Hunden ohne und mit geringgradiger A β -Pathologie (Satou-Stadien 0 bzw. 1). Tiere mit Tauablagerungen hatten geringgradig weniger Zellen im Gyrus postcruciatatus als Tiere ohne Neuropathologie (Satou-Stadium 0). B) Im entorhinalen Kortex wiesen Hunde mit Tau-Pathologie und den Satou-Stadien 1 bis 3 weniger Mikroglia gegenüber Tieren ohne A β -Ablagerungen (Satou-Stadium 0) auf. Die höchste Anzahl an Mikroglia wurde bei Hunden mit dem Satou-Stadium 4 gemessen.

Bei Kontrolltieren ohne Neuropathologie (Satou-Stadium 0) wurden 14.244 Mikroglia/mm³ erfasst. Sie hatten deutlich mehr Zellen im Cornu ammonis als Tiere mit dem Satou-Stadium 3 mit 10.098 Zellen/mm³. Ein weiterer signifikanter Unterschied in der Anzahl an Mikroglia bestand zwischen Tieren, bei denen neben A β -Plaques auch tau-positive Strukturen im Cornu ammonis nachgewiesen wurden und Hunden mit Satou-Stadium 3. Dabei besaßen Hunde mit A β - und Tau-Pathologie mit nachweislich rund 15.900 Mikroglia/mm³ eine wesentlich höhere Anzahl an Mikroglia. Ebenso zeigten Tiere mit geringgradiger A β -Pathologie im Cornu ammonis (Satou-Stadium 1) erkennbar mehr Mikroglia pro mm³ gegenüber Tieren mit Satou-Stadium 3. Durchschnittlich wurden bei Hunden mit Satou-Stadium 1 rund 18.366 Mikroglia/mm³ erfasst (Abb. 4.26 A).

Im Gyrus dentatus konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Satou-Stadien und der Anzahl an Mikroglia festgestellt werden. Bei Hunden, die den

Ergebnisse

Satou-Stadien 2 und 3 zugeordnet waren, wurden weniger Mikroglia pro mm^3 als bei Tieren der anderen Gruppen erfasst (Abb. 4.26 B).

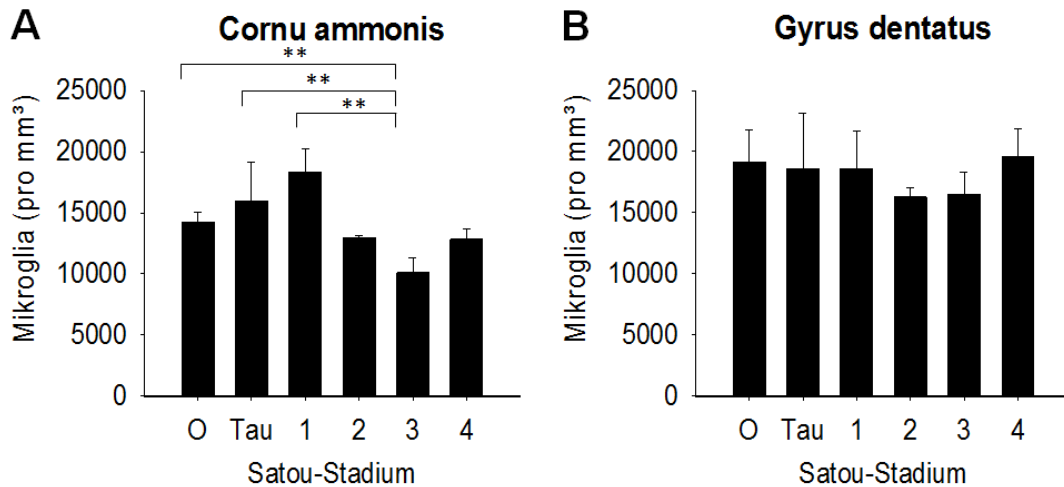


Abb. 4.26: Anzahl an Mikroglia in der Hippokampusformation in Abhängigkeit vom Satou-Stadium

A) Im Cornu ammonis zeigten Tiere mit dem Satou-Stadium 3 eine wesentlich geringere Anzahl an Mikroglia gegenüber Hunden mit Tauablagerungen. Hunde ohne Neuropathologie (Satou-Stadium 0) besaßen deutlich mehr Mikroglia pro mm^3 im Cornu ammonis als Tiere mit dem Satou-Stadium 3. B) Im Gyrus dentatus waren vergleichsweise weniger Mikroglia pro mm^3 bei Hunden mit den Satou-Stadien 2 und 3 vorhanden. Tiere mit einer hochgradigen A β -Pathologie (Satou-Stadium 4) besaßen die höchste Anzahl an Mikroglia pro mm^3 .

4.5.4.2 Untersuchung der Anzahl der Mikroglia in Assoziation zu den Größen- und Gewichtskategorien

Bezüglich der mittleren Anzahl der Mikroglia pro mm^3 in der grauen Substanz des Gyrus postcruciatatus bestand ein signifikanter Unterschied mit $P < 0,05$ zwischen den Tieren der Kontrollgruppe (Fälle 1 - 5) und den alten Hunden (Fälle 6 - 24), wie in Abbildung 4.27 graphisch dargestellt wurde. Dabei wiesen alte Hunde eine erhöhte mittlere Anzahl von 14.957 Mikroglia/ mm^3 gegenüber den Kontrolltieren mit 11.983 Mikroglia/ mm^3 auf.

Beim Vergleich der einzelnen Größen- und Gewichtskategorien der alten Hunde und der Kontrollgruppe wurde kein erkennbarer Unterschied in der mittleren Anzahl an Mikroglia pro mm^3 vorgefunden ($P = 0,198$).

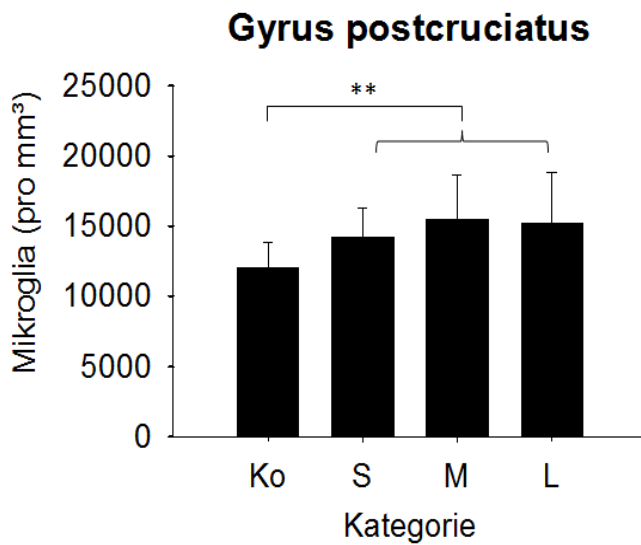


Abb. 4.27: Anzahl an Mikroglia im Gyrus postcruciatus in Abhängigkeit von der Kategorie

In der untersuchten Region besaßen alte Hunde der Kategorien S, M und L erheblich mehr Mikroglia pro mm³ als die Kontrolltiere (Ko).

Ein Vergleich der mittleren Anzahl an Mikroglia pro mm³ innerhalb des ventralen Hippokampus zwischen der Kontrollgruppe und den alten Hunden wies keinen erkennbaren Unterschied in den Regionen Gyrus dentatus ($P = 0,395$) und Cornu ammonis ($P = 0,250$) auf.

Zusätzlich bestand keine statistische Signifikanz zwischen dem Vorkommen von 14.559 bis 16.996 Mikroglia/mm³ im Cornu ammonis der drei Kategorien S, M und L der alten Hunde und dem vergleichsweise niedrigem Wert von 12.244 Mikroglia/mm³ im Cornu ammonis der Kontrollgruppe. Der P-Wert für diese Statistik betrug 0,247.

Auch im Gyrus dentatus waren die Unterschiede in der Anzahl der Mikroglia pro mm³ bei jungen Hunden sowie kleinen, mittelgroßen und großen Tieren mit $P = 0,570$ nicht signifikant.

Im entorhinalen Kortex konnte kein signifikanter Unterschied ($P = 0,288$) zwischen der mittleren Anzahl an Mikroglia pro mm³ der Kontrollgruppe und der alten Hunde ermittelt werden. Ebenso bestand zwischen der Anzahl der Mikroglia pro mm³ innerhalb der einzelnen Kategorien der alten Hunde keine Signifikanz ($P = 0,594$).

4.5.5 Nachweis HLA DR-positiver Mikroglia

4.5.5.1 Kontrollgruppe

Die immunhistologische Darstellung des HLA-DR, eines Oberflächenrezeptors der MHC Klasse II, erfolgte an Kryoschnitten von zwei jungen Hunden (Fälle 2 und 5) mittels des Antikörpers TAL.1B5. In der grauen Substanz des frontalen Kortex fanden sich keine HLA-DR-positiven Mikroglia (Abb. 4.28 A). Mikroglia der weißen Substanz waren jedoch HLA-DR-positiv (Abb. 4.28 B). Diese lagen regulär verteilt vor und besaßen eine eher schwache Farbintensität. Die Zellkörper waren klein und hatten eine rundliche bis längliche Gestalt. Von ihnen gingen zahlreiche Fortsätze mit feinen Verzweigungen aus (Abb. 4.28 B). In der Hippokampusformation, speziell im Gyrus dentatus und Cornu ammonis, lagen keine HLA-DR-positiven Mikroglia bei den Kontrolltieren vor (Abb. 4.28 C, D). Auch im entorhinalen Kortex wurden keine HLA-DR-positiven Mikroglia nachgewiesen.

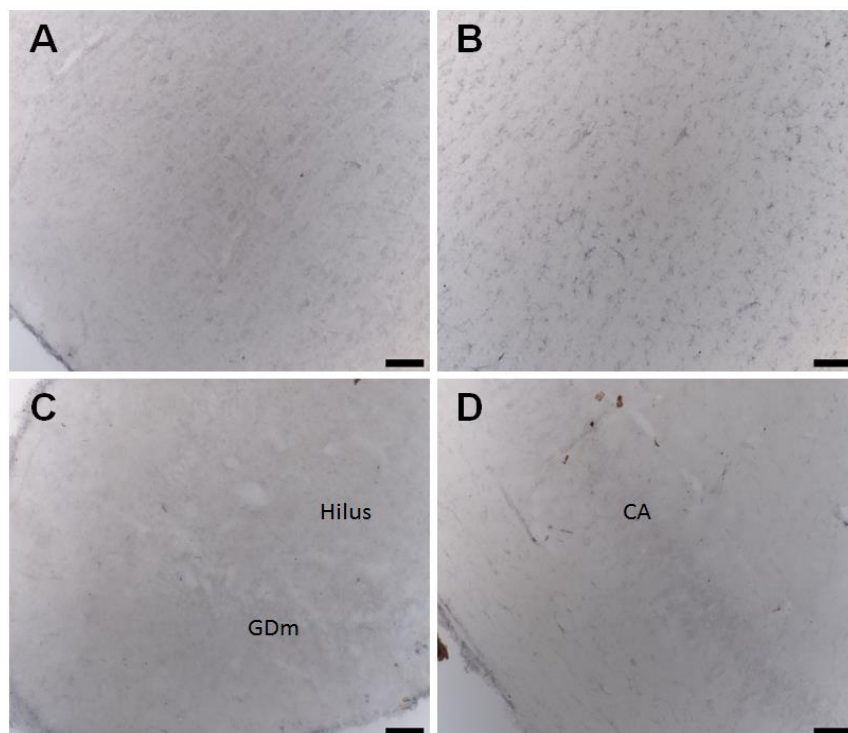


Abb. 4.28: HLA-DR-positiv Mikroglia bei den Kontrolltieren

Die Markierung der Mikroglia erfolgte mit dem Antikörper TAL.1B5. A) In der grauen Substanz der Kontrollhunde lagen keine HLA-DR-positiven Mikroglia vor. B) Schwach positive Färbung der Mikroglia in der weißen Substanz. C) Fehlen von positiven Mikroglia im Stratum moleculare des Gyrus dentatus (GDm) und D) im Cornu ammonis (CA). Maßstabsbalken: 100 µm.

4.5.5.2 Alte Versuchshunde

Die Färbung von HLA-DR-positiven Mikroglia erfolgte an Kryoschnitten von sechs alten Hunden (Fälle 8, 11, 16, 18, 20 und 23) mit unterschiedlich starker Neuropathologie. Immunpositive Mikroglia fanden sich in der grauen und weißen Substanz des frontalen Kortex und im Hippokampus. Vereinzelt wurden immunpositive Mikroglia im entorhinalen Kortex beobachtet.

In der grauen Substanz des frontalen Kortex lagen HLA-DR-positive Mikroglia im Parenchym und in Assoziation zu Gefäßen vor. Einige Zellen wiesen deutlich gefärbte, runde bis länglich geformte Zellkörper auf (Abb. 4.29 B). Von diesen gingen kurze, kräftige Fortsätze aus, denen feine Verzweigungen fehlten. Anzeichen für Dystrophien der immunpositiven Mikroglia fanden sich in der grauen Substanz der Fälle 16, 18, 20 und 23. Einige Mikroglia besaßen bulböse Auftreibungen in den Fortsätzen. Stellenweise lagen Mikroglia auch als Zellkoagula zusammen (Abb. 4.29 C).

In der weißen Substanz waren HLA-DR-positive Mikroglia entlang des Faserverlaufs orientiert und dichter organisiert als in der grauen Substanz. Immunpositive Mikroglia der weißen Substanz besaßen eine unterschiedliche Morphologie. Einige Zellen besaßen längliche Zellkörper mit langen, verzweigten Fortsätzen, die parallel und im rechten Winkel zu den Axonen verliefen. Andere Mikroglia hatten einen großen Zellkörper mit kurzen, dünnen Fortsätzen, die sich kaum verzweigten (Abb. 4.29 E, F).

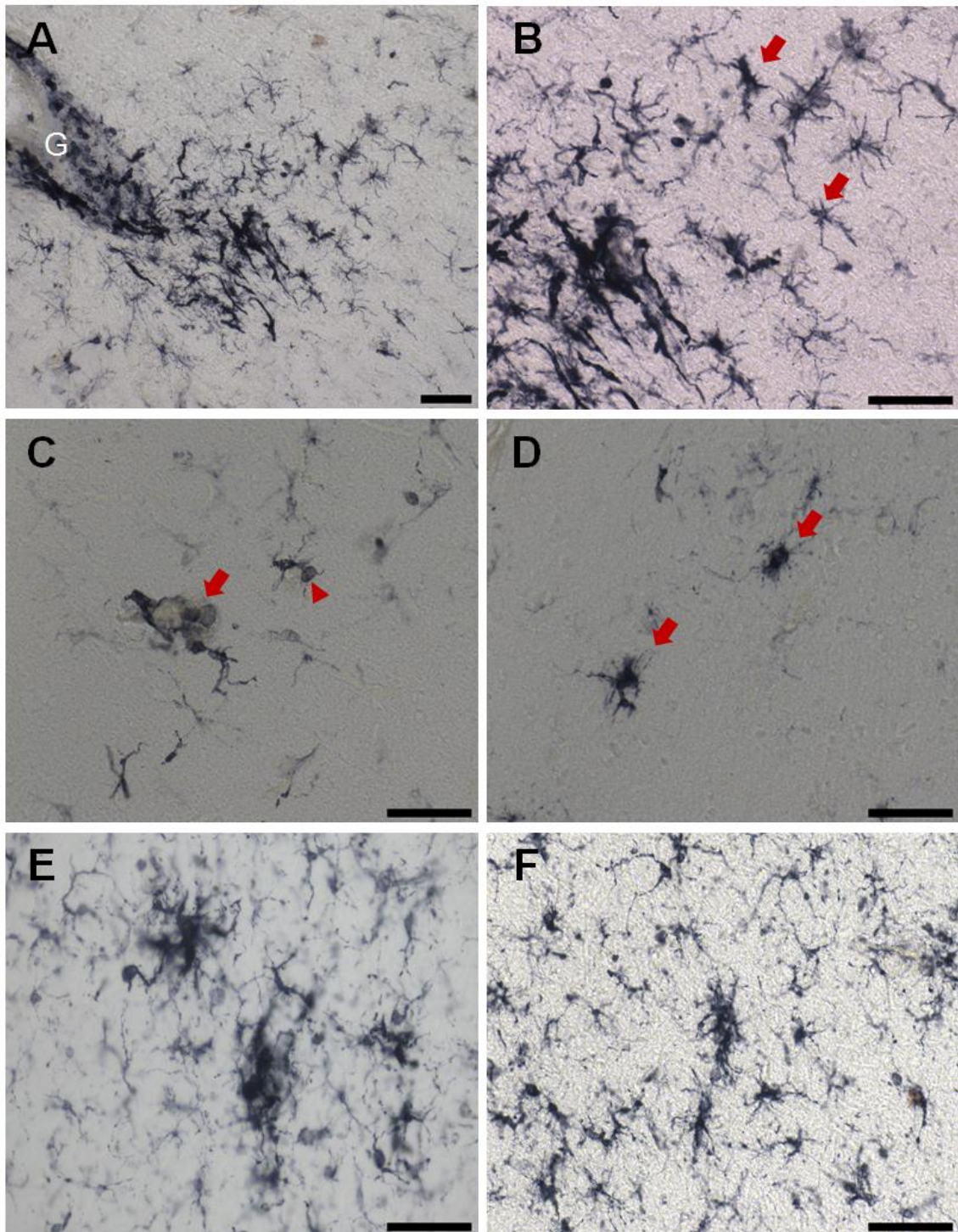


Abb. 4.29: HLA-DR-positive Mikroglia bei alten Versuchshunden

Dargestellt sind Mikroglia des frontalen Kortex von alten Hunden, die mittels TAL.1B5 markiert wurden. A) Positive Mikroglia der grauen Substanz lagen nahe eines Gefäßes (G) bei Fall 12. B) Vergrößerte Darstellung der immunpositiven, aktivierten Mikroglia (Pfeile). C) Degenerierte (Pfeil) und dystrophische Mikroglia mit bulböser Auftreibung eines Fortsatzes (Pfeilspitze) in der grauen Substanz des Gyrus postcruciatu von Fall 23. D) Aktivierte, immunpositive Mikroglia (Pfeile) in der weißen Substanz des frontalen Kortex (Fall 18). E) Mikroglia der weißen Substanz von Fall 8 und F) Fall 20. Maßstabsbalken: 60 μ m (A); 50 μ m (B - F).

Ergebnisse

Im Hippokampus wurden HLA-DR-positive Mikroglia des Gyrus dentatus und des Cornu ammonis untersucht. Im Hilus des Gyrus dentatus lagen wenige immunpositive Mikroglia vor. Diese wiesen kleine, intensiv gefärbte Zellkörper mit kurzen, verdickten Fortsätzen auf (Abb. 4.30 A).

HLA-DR-positive Mikroglia des Cornu ammonis fanden sich hauptsächlich im Stratum oriens. Vereinzelt wurden auch aktivierte Mikroglia im Stratum lacunosum-moleculare beobachtet. Im Stratum pyramidale eines 13,5 Jahre alten Hundes (Fall 12) lagen aktivierte Mikroglia mit intensiv gefärbten Zellkörpern und verdickten, wenig verzweigten Fortsätzen vor (Abb. 4.30 B).

Einige Mikroglia in den untersuchten Hirnarealen von fünf 10 bis 18 Jahre alten Hunden (Fälle 8, 11, 16, 20 und 23) besaßen dystrophische Veränderungen. Diese Zellen wiesen bulböse Auftreibungen und Fragmentierungen der Fortsätze auf (Abb. 4.30 C). Zudem fanden sich Zellkoagula aus immunpositiven Mikroglia (Abb. 4.30 D). Die wenigen HLA-DR-positiven Mikroglia des entorhinalen Kortex besaßen einen runden Zellkern, der keine Fortsätze aufwies. Diese Mikroglia waren stets mit Gefäßen assoziiert.

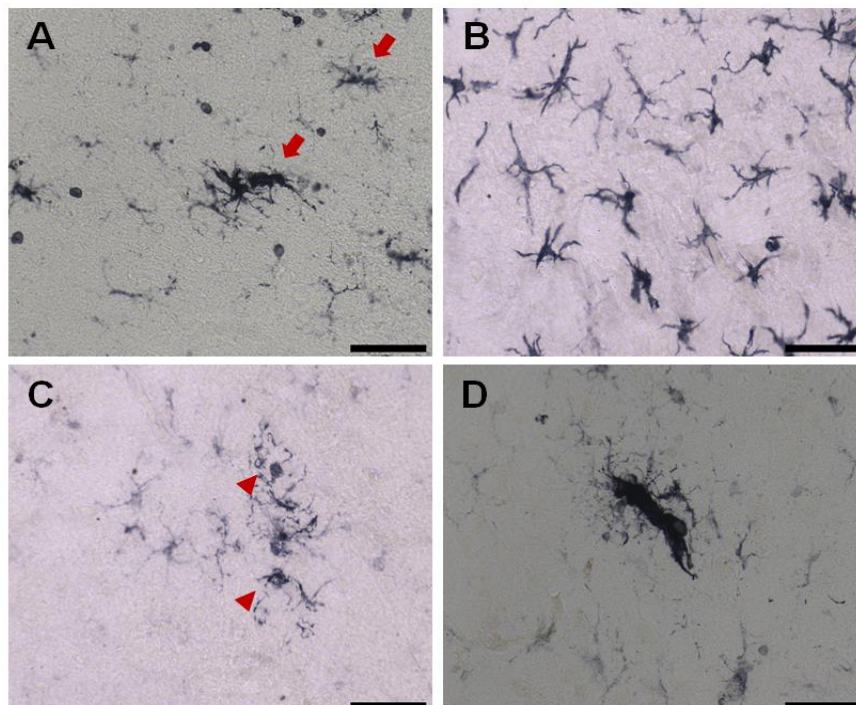


Abb. 4.30: HLA-DR-positive Mikroglia der Hippokampusformation

A) Aktivierte Mikroglia im Gyrus dentatus von Fall 20 und B) im Cornu ammonis von Fall 12. C) Mikroglia mit fragmentierten Fortsätzen im Gyrus dentatus (Fall 12). D) Koagula aus immunpositiven Mikroglia im Cornu ammonis von Fall 23. Maßstabsbalken: 50 µm.

Ergebnisse

Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht zur erhobenen Neuropathologie und der Morphologie der HLA-DR-positiven Mikroglia in den untersuchten Gehirnregionen.

Tabelle 4.2: Vergleich der Neuropathologie mit der Morphologie der Mikroglia

Tiernummer	A β	Tau	Mikroglia
2	nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen	ramifiziert
5	nicht nachgewiesen	nicht nachgewiesen	ramifiziert
8	hochgradig (Satou 3), hochgradig CAA	nicht nachgewiesen	aktiviert
11	geringgradig (Satou 1), geringgradig CAA	mittelgradig	ramifiziert, aktiviert oder dystrophisch verändert
16	geringgradig (Satou 1), mittelgradig CAA	hochgradig	
18	geringgradig (Satou 1), geringgradig CAA	mittelgradig	
20	hochgradig (Satou 3), mittelgradig CAA	nicht nachgewiesen	vorwiegend aktiviert
23	mittelgradig (Satou 2), hochgradig CAA	nicht nachgewiesen	vorwiegend aktiviert

5 Diskussion

5.1 Hundepopulation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bestimmte Aspekte einer altersbedingten Proteinablagerung im Gehirn von Hunden näher zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden insbesondere die Verteilung einer A β -Proteinpathologie, die Morphologie der A β -Ablagerungen und die Häufigkeit der A β -Subtypen pE3A β und A β ₈₋₁₇ in bestimmten Gehirnregionen analysiert. Die Detektion des hyperphosphorylierten Tau-Proteins wurde mit der Fragestellung vorgenommen, ob und in welchem Umfang eine Tau-Pathologie im caninen Gehirn besteht. Ein weiteres Ziel bestand darin, die Auswirkungen einer A β - und Tau-Pathologie auf die Morphologie und die Reaktion vorliegender Mikroglia zu untersuchen. Zur Darstellung einer Relation zwischen der altersbedingten Neuropathologie und der verschiedenen Größen und Gewichte der Hunde wurden die erhobenen Daten entsprechend interpretiert.

Für diese Untersuchungen lag eine heterogene Population von Hunden verschiedener Größen und Gewichte vor. Das häufig bei alten Hunden vorkommende kognitive Dysfunktionssyndrom kann in vielen Aspekten mit Morbus Alzheimer verglichen werden (Head, 2010). Die Heterogenität der untersuchten Hunde entsprach einem natürlichen Tiermodell und erlaubte Untersuchungen der Alterungsprozesse am caninen Gehirn, die als weitgehend vergleichbar mit der Situation beim Menschen angesehen werden können.

Ab einem Alter von 10 Jahren zeigten alle untersuchten Hunde A β -Ablagerungen im frontalen und entorhinalen Kortex sowie in der Hippokampusformation. Die altersassoziierte Pathologie des frontalen Kortex bestätigte die Beobachtungen von SATOU et al. (1997), anhand derer eine Einteilung in vier Stadien erfolgte. Stadium 1 wird charakterisiert durch geringgradige, die Stadien 2 und 3 durch mittelgradige und das Stadium 4 durch hochgradige pathohistologische Veränderungen im frontalen Kortex.

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich altersassoziierte Veränderungen in der Hippokampusformation und im entorhinalen Kortex immunhistochemisch charakterisiert. Auch beim Morbus Alzheimer repräsentieren diese Gehirnregionen Gebiete mit einer charakteristischen Proteinpathologie (BRAAK & BRAAK,

1991; HÄRTIG et al., 2001). Das Auftreten und die Verteilung von A β -Ablagerungen in bestimmten Hirnregionen folgt beim Menschen und, wie die eigenen Ergebnisse zeigen, auch bei Hunden einem spezifischen, progressiv verlaufenden Muster. Studien, die bereits an bestimmten Gehirnregionen alter Hunde durchgeführt wurden, unterstützen die eigenen Ergebnisse (HEAD, 2011; CZASCH, 2001). Allerdings fehlte diesen Studien die Beschreibung der progressiven Neuropathologie in der Hippokampusformation. Zusätzlich erfolgte bisher keine einheitliche Einteilung der Plaques anhand den Satou-Stadien (CZASCH, 2001).

In den letzten Jahrzehnten wurde besonders bei kleinen Hunden eine Erhöhung der Lebenserwartung beobachtet, die stark von genetischen Faktoren beeinflusst wird. Aber auch nicht-genetische Kriterien üben einen Einfluss auf die Lebensspanne aus (MILLER & AUSTAD, 2006). Aus tierärztlicher Sicht bedeutet die erhöhte Lebenserwartung der kleinen Hunderassen auch einen Anstieg von Fällen mit neurodegenerativen Erkrankungen (SARASA & PESINI, 2009). Die immunhistochemischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass auch im Gehirn von alten Hunden, bei denen keine klinischen Symptome vom Besitzer und dem behandelnden Tierarzt beschrieben wurden, erste altersassoziierte Veränderungen auftreten können.

5.2 Pathologisch-histologische Untersuchung der Gehirne

Das CCDS ist eine altersassoziierte Erkrankung, die mit charakteristischen histopathologischen Veränderungen des Gehirns einhergeht. Pathognomisch sind Ablagerungen von A β -Peptiden, die Hyperphosphorylierung mit anschließender Ablagerung des Tauproteins sowie die Degeneration von Neuronen mit Verlust kognitiver Fähigkeiten (HEAD, 2001).

Altersassoziierte Befunde, die nicht zwangsläufig für CCDS charakteristisch sind (ROFINA et al., 2006), wurden auch in den untersuchten Gehirnen dieser Arbeit erhoben. Eine Erweiterung der Hirnventrikel trat häufig mit zunehmendem Alter auf und betraf insbesondere die Lateralventrikel. Aus der Literatur ist bekannt, dass regelmäßig auch jüngere Hunde brachyzephaler Rassen diesen Befund aufweisen (ZACHARY, 2012).

Die progressive Sklerose meningealer Venen und Arterien, die bei Hunden ab 14 Jahren dokumentiert wurde, spielt eine wichtige Rolle bei zerebrovaskulären

Erkrankungen (MASORO, 2006). Von Studien am Menschen ist bekannt, dass Vaskulopathien im Gehirn zu Störungen der Makro- und Mikrozirkulation führen und potentiell auch die Entstehung der Alzheimer-Krankheit begünstigen können (CASSERLY & TORPOL, 2004).

TAPP et al. (2004) fanden in Gehirnen von alten Hunden, insbesondere im frontalen Kortex, altersabhängige pathohistologische Veränderungen. So wurde im frontalen Kortex von Beagles bereits ab dem 8. Lebensjahr eine Atrophie der grauen Substanz gefunden. Die eigenen Ergebnisse zum Anteil der grauen Substanz in den frontalen Kortices der Kontrollgruppe und der alten Hunde zeigten dagegen keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Lipofuszinablagerungen in den Neuronen und in Mikroglia sind ein Charakteristikum der caninen Ceroid-Lipofuszinose (JOLLY et al., 1994). Diese autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung wird entsprechend des Lebensalters des Hundes bei der ersten klinischen Symptomatik in drei Formen unterteilt: vor der Pubertät; im frühen adulten Alter von 1 bis 2 Jahren und die Form der älteren adulten Hunde von 2 bis 8 Jahren. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung in Form von Erblindung, motorischen Störungen mit Ataxie, Tremor, Krämpfen und Bruxismus sowie durch propriozeptive Defizite und Veränderungen des Verhaltens mit Verwirrung, Angstzuständen und Aggression. Bei post-mortem-Untersuchungen des Gehirns erscheint der Kortex gelblich und besitzt eine derbe Konsistenz. Der zerebrale Kortex und das Cerebellum sind atrophisch (JOLLY et al., 1994). Keines der untersuchten Gehirne der vorliegenden Studie wies neben den beschriebenen Lipofuszinablagerungen weitere Merkmale einer caninen Ceroid-Lipofuszinose auf. Zudem lagen bei keinem der von mir untersuchten Hunde anamnestiche Daten zu dieser Erkrankung vor, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die dokumentierten intrazellulären Ablagerungen in Folge des Alterungsprozesses auftraten.

Interessanterweise wurden in den Gehirnen der alten Hunde keine Hirano-Körperchen und granulovakuläre Degenerationen als Merkmale degenerativer Neurone beobachtet.

5.3 A β -Pathologie

5.3.1 Parenchymale A β -Plaques

Zur Darstellung des Gesamt-A β wurde ein gegen A β_{8-17} -gerichteter Antikörper genutzt. Dieser bindet unspezifisch an Amyloidsubtypen mit der Aminosäurefrequenz A β_{x-42} und A β_{x-40} . Aus früheren Studien an alten Hunden und Menschen sind Aspekte des pathologischen Verlaufs der A β -Ablagerungen bereits bekannt (HEAD, 2001; THAL et al., 2006). Im progressiven Verteilungsmuster von caninen Plaques besteht eine weitere Parallele zum Morbus Alzheimer (SARASA & PESINI, 2009). Bei Menschen wurde eine retrograde Ablagerung von A β -Plaques beschrieben, wobei diffuse Plaques im initialen Stadium vorherrschten (YAMAGUCHI et al., 1988). Auch bei den von mir untersuchten Hunden konnten überwiegend diffuse Plaques beobachtet werden, die sich insbesondere im frontalen Kortex ablagerten. Die Größe dieser Plaques variierte zum Teil erheblich, was auch in Studien an menschlichem Kortex beobachtet wurde (YAMAGUCHI et al., 1991).

Primitive Plaques lagen insbesondere bei alten kleinen Hunden vor und gingen mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung einher. Eine Ablagerung von A β im Hippokampus und entorhinalen Kortex schien zeitlich versetzt zur Pathologie des frontalen Kortex stattzufinden. Neben diffusen und primitiven Plaques im frontalen und im entorhinalen Kortex wurden auch Ablagerungen von „fleecy A β “ in der Hippokampusformation beobachtet. Klassische und „cored-only“ Plaques wurden in den Gehirnen der alten Hunde nicht gefunden.

In dieser Studie erfolgte erstmalig die Beschreibung und Quantifizierung von pE3A β im Gehirn von Hunden. Die Daten gleichen denen, die in humanen Gewebe erhoben wurden (GRUYS, 2004; HARTLAGE-RÜBSAMEN et al., 2011; NUSSBAUM et al., 2012). So wurden Plaques, bestehend aus pE3A β , bereits bei Hunden ab einem Alter von 9 Jahren detektiert. Diese lagerten sich progressiv in den untersuchten Gehirnregionen ab. Regionsspezifisch lagen wesentlich mehr pE3A β -Plaques als Plaques aus A β_{8-17} vor, insbesondere den frontalen Kortex und ventralen Hippokampus betreffend.

Modifiziertes pEA β wird als Indikator für ein frühes Stadium des Morbus Alzheimer diskutiert (JAWHAR et al., 2011; SCHILLING et al., 2008), was die hohe Relevanz dieses A β -Subtyps verdeutlicht. Allerdings eignen sich transgene Mausmodelle nur bedingt zur translationalen Erforschung der Pathomecha-

nismen des pE3A β , da sie im Vergleich zum Menschen eine Unterexpression dieses modifizierten A β -Subtyps aufweisen. Außerdem existieren zeitliche Unterschiede im Auftreten von pE3A β -enthaltenden Plaques zwischen Menschen und Mausmodellen. So konnte pE3A β in den Modellen Tg2576 und APP^{SL}PS1KI nur bei sehr alten Mäusen nachgewiesen werden (GUNN et al., 2010). Die Hunde der vorliegenden Studie dagegen zeigten in den untersuchten Kortices bereits ab dem Alter von 9 Jahren Ablagerungen, in denen pE3A β detektiert wurde. Die Daten zum pE3A β deuten darauf hin, dass geriatrische Hunde als geeignetes Tiermodell zur weiteren Erforschung der frühen A β -Pathologie genutzt werden können.

Die Menge an A β ₈₋₁₇-enthaltenden Plaques im frontalen Kortex und ventralen Hippokampus war größer bei kleinen und mittelgroßen Hunden im Vergleich zu den großen Hunden. Betrachtet man das kürzere Lebensalter von großen Hunden, so ist vorstellbar, dass diese Tiere seltener ein Alter erreichen, welches mit einer ausgeprägten und hochgradigen A β -Pathologie einhergeht. Tatsächlich haben große Hunde eine intensivere und kürzere Wachstumsphase und entwickeln sich schneller als kleinere Vertreter ihrer Art (PATRONEK et al, 1997; TRYFONIDOU et al., 2003). Dieser ontogenetische Aspekt ist mit einer höheren Mortalitätsrate bei großen Hunden ab einem Alter von 6 Jahren verbunden (GALIS et al., 2007). Die kürzere Lebenserwartung großer Hunde kann durch eine hohe Wachstumsrate mit relativ früh einsetzenden Schädigungen durch oxidativen Stress bedingt sein (ROLLO, 2002). Allerdings zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass in Gehirnen von großen Hunden keine gesteigerte A β -Histopathologie auftritt. Dieser Befund wird durch die These von NAKAYAMA et al. (2004) des ungleichen Alterns von Körper und Gehirn gestützt. Gleichzeitig widerlegen die Ergebnisse meiner Arbeit die These von HEAD et al. (2010), dass die kürzere Lebenserwartung von großen Hunden eine verstärkte oder früher beginnende A β -Ablagerung im Gehirn dieser Tiere bedeuten könnte.

Basierend auf den ähnlichen histopathologischen Befunden bietet die altersassoziierte Pathologie in Gehirnen von kleinen Hunden eine bessere Vergleichbarkeit zur menschlichen Situation. Als natürliches Tiermodell eignen sich Hunde auch deshalb, weil der Schweregrad der Befunde unterschiedlich war und nicht bei allen alten Tieren von einer Beeinträchtigung kognitiver Funktionen begleitet wurde. Vermutlich ist eine klinische Symptomatik nicht ausschließlich

mit dem Auftreten und dem Schweregrad der A β -Pathologie korreliert, sondern auch abhängig von anderen Faktoren, wie einer altersassoziierten Veränderung der mikroglialen Funktion und einer gegebenenfalls vorhandenen Tau-Pathologie.

5.3.2 Gefäßassoziiertes A β -Protein

In allen untersuchten Gehirnregionen wurden mit unterschiedlich starker Intensität Ablagerungen von pE3A β und A β ₈₋₁₇ in den kleineren parenchymalen Gefäßen, vorwiegend Kapillaren und den größeren meningealen Arteriolen und Venen gefunden. Einige Tiere, wie ein 10 Jahre alter Mischlingshund, zeigten eine besonders hochgradige CAA. Neben unbekanntem genetischen Faktoren ist es auch möglich, dass A β -Peptide aus der Peripherie über bestimmte Rezeptoren der BHS ins Gehirn gelangten und in den kleineren Gefäßen akkumulierten. In den Gehirnen von Rhesusaffen und Totenkopffaffen konnte der Transport von markierten A β -Peptiden über eine intakte BHS nachgewiesen werden (MACKIC et al., 2002). Neben dem Rezeptor für Endprodukte einer fortgeschrittenen Glykosylierung gibt es weitere Rezeptoren, die A β in das Gehirn transportieren können und altersassoziiert funktionelle Veränderungen zeigen (DEANE et al., 2003; PASCALE et al., 2011). Folglich könnten die im Gehirn beobachteten gefäßassoziierten und parenchymalen A β -Ablagerungen auf unterschiedliche Weise gebildet werden. Zur eindeutigen Aufklärung des Ursprungs der gefäßassoziierten Ablagerungen in den Gehirnen von Hunden sind weitere Untersuchungen nötig.

5.4 Tau-Pathologie

5.4.1 Häufigkeit innerhalb der Hundepopulation und kritische Wertung der Färbemethodik

Intraneuronale tau-positive Aggregate sind bereits in einer H&E-Färbung erkennbar (FULLER & BURGER, 2007). Allerdings eignet sich diese Methode beim Hund nicht zum eindeutigen Nachweis von NFTs. Die immunhistologische Färbung des caninen Proteins mit dem gegen humane Epitope des hyperphosphorylierten Tau gerichteten Antikörpers AT8 zeigte gute Resultate. Eine Färbung von caninen Tauprotein mit dem humanen Antikörper wird vermutlich

durch die 82%ige Übereinstimmung zwischen dem humanen und caninen Protein möglich (NCBI Blast).

Obwohl NFTs als wichtiges Merkmal der Alzheimer-Krankheit gelten (BALLARD et al., 2011), sind sie nicht spezifisch für diese Neuropathologie (JELLINGER, 2001). Allerdings sind zelluläre Veränderungen in Form von Fibrillenbildung charakteristisch für einen Zelluntergang im alternden Gehirn (BANATI & BEYREUTHER, 1995).

In der vorliegenden Studie waren die Gehirne von 15,8 % der 8 bis 19 Jahre alten Hunde von Tau-Pathologien betroffen. Das Verteilungsmuster der Tau-Pathologien in den Gehirnen der alten Hunde unterschied sich zu den beim Menschen prädisponierten Regionen (ATTEMS et al., 2012). So zeigten sich in den caninen Gehirnen keine NFTs in der transentorhinalen Region oder in neokortikalen Bereichen.

Nur ein Hund aus der untersuchten Population wies eine hochgradige Tau-Pathologie inklusive der Formation von flammenförmigen NFTs, Neuropilfäden und vereinzelt neuritischen Plaques in der Hippokampusformation auf. Interessanterweise lagen außerhalb des limbischen Systems keine Tauaggregate vor. In früheren Studien an Gehirnen von Hunden wurden tau-positive Neurone auch im frontalen und parietalen Kortex nachgewiesen (PAPAIOANNOU et al., 2001; WEGIEL et al., 1998; YU et al., 2011). Allerdings existierten bisher keine Befunde über eine hochgradige Tau-Pathologie beim Hund. Als mögliche Ursache argumentierten YU et al. (2011), dass die Bildung von NFTs in Folge der limitierten Anzahl an Phosphorylierungsstellen am caninen Protein nicht möglich sei. Eigene Studien mit Antikörpern, die gegen diverse Epitope des humanen Tauproteins gerichtet waren und zur Detektion von hyperphosphorylierten Tau im caninen Gewebe eingesetzt wurden, zeigten allerdings, dass es potentiell mehr Phosphorylierungsstellen am caninen Tauprotein gibt als von YU und Kollegen angenommen. Auch die in früheren Studien verwendeten Methoden müssen kritisch betrachtet werden. So konnten CZASCH et al. (2006) nachweisen, dass verschiedene, zur post-mortem-Diagnostik von Morbus Alzheimer verwendete Silberfärbungen, wie z.B. die Methode nach Gallyas und die modifizierte Bielschowsky-Färbung zum Nachweis einer Pathologie beim Hund deutlich weniger sensitiv sind als die immunhistochemischen Verfahren. Mit der Anwendung immunhistochemischer Fär-

bungen zur Darstellung des pathologischen Tauproteins (Antikörper AT8) und des A β (Antikörper 6F3D) befolgt diese Arbeit die Empfehlungen von THAL & BRAAK (2005) zur zeitgemäßen post-mortem-Diagnostik einer altersassoziierten Proteinpathologie.

Die vorliegenden Ergebnisse und die wenigen bekannten Einzelfälle wie ein 15 Jahre alter Welsh Corgi und ein gleichaltriger Springer Spaniel mit Demenz (Papaioannou et al., 2001) lassen darauf schließen, dass die Hyperphosphorylierung von caninen Tau bei alternden Hunden stattfinden kann, die Formation von NFTs allerdings ein fallbezogener Prozess ist. Die Entwicklung von Markern zur Erkennung dieser Hunde intra vitam ist eine Möglichkeit für zukünftige Studien auf translationaler Ebene.

5.4.2 Zusammenhang der Tau-Pathologie mit den A β -Ablagerungen

A β -Oligomere können eine Tau-Pathologie induzieren, indem sie eine Fehlsortierung von endogenem Tau in die Dendriten, die Tauphosphorylierung und den Abbau von Mikrotubuli bewirken (ZEMPEL et al., 2010). Allerdings besaßen die Hunde der vorliegenden Studie, die tau-positive Neurone in der Hippokampusformation ausbildeten, einen relativ geringen Anteil an A β_{8-17} und pE3A β .

Ob A β - und Tauablagerungen beim Hund zwei unabhängige Prozesse darstellen ist nicht vollständig geklärt. Einen Hinweis darauf, dass die Bildung von A β - und Tauaggregaten autonome Vorgänge sind, lieferten beim Menschen Erkrankungen, die mit Tauablagerungen bei fehlender A β -Pathologie einhergehen. Dazu gehört die frontotemporale Demenz mit Parkinson beim Menschen, wobei eine Mutation im Chromosom 17 vorliegt, welches unter anderem das Tauprotein codiert (JELLINGER, 2001). Jedoch erfolgte bislang keine Untersuchung an alten Hunden auf ähnliche Mutationen, die die fehlerhafte Phosphorylierung des Tauproteins begünstigen könnten.

Möglicherweise fand, angesichts des mittleren Alters von den drei Tieren, die Bildung von NFTs unabhängig der A β -Pathologie und beschleunigt statt (NAKAYAMA et al., 2004). Welche endogenen und gegebenenfalls auch exogenen Faktoren hierbei eine Rolle spielen könnten, sollte zukünftig erforscht werden. Eine denkbare endogene Ursache könnte die Seneszenz der Mikroglia darstellen. Die Beeinträchtigung ihrer trophischen Funktion gegenüber Neuro-

nen könnte die Neurodegeneration beschleunigen und mit klinischen Symptomen einhergehen.

5.5 Mikroglia

5.5.1 Unterschiede in der Anzahl der Mikroglia zwischen jungen und alten Hunden

Sowohl bei den jungen als auch bei den alten Hunden wurden einzeln vorliegende, mittels Iba1 markierte Mikroglia stereologisch erfasst. Der Aktivierungsstatus der Mikroglia wurde dabei nicht berücksichtigt. Allerdings ist bekannt, dass die Aktivierung der Mikroglia mit einer erhöhten Mitoserate einhergeht (STREIT et al., 2004a). Dennoch bestand im Gyrus postcruciatum der untersuchten Gehirne kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl an Mikroglia bei jungen und alten Hunden. Im entorhinalen Kortex und im Gyrus dentatus war die Anzahl an Mikroglia bei Tieren mit einer Tau-Pathologie und den Satou-Stadien 1 bis 3 sogar geringer im Vergleich zu derjenigen der Kontrollgruppe. Möglicherweise führte die zeitlich versetzt beginnende A β -Pathologie in den retrograd gelegenen Gehirnregionen zu einer später einsetzenden mikroglialen Reaktion. Im Cornu ammonis hingegen ließen sich wesentliche Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe ohne Ablagerungen und alten Tieren mit unterschiedlich schwerer Proteinpathologie erkennen. Insbesondere Tiere mit hyperphosphoryliertem Tau und dem Satou-Stadium 1 besaßen wesentlich mehr Mikroglia als Tiere mit dem Satou-Stadium 3. Als mögliche Ursache für diese erheblichen Unterschiede könnte ein starker initialer Reiz des A β bei Tieren im Satou-Stadium 1 sein. Auch ein ausgeprägter Stimulus auf die Mikroglia durch die Aggregation des Tau-Proteins kann in Betracht gezogen werden. Bei Tieren mit mittel- bis hochgradiger A β -Pathologie fand gegebenenfalls bereits eine Degeneration der Mikroglia statt.

Die erhobenen Daten aus Untersuchungen an Hunden unterscheiden sich von Ergebnissen aus Studien an Nagern. In einer stereologischen Studie von LONG et al. (1999) an männlichen C57BL/6J-Mäusen entwickelten diese Tiere keine altersassoziierte Veränderung der Anzahl an Mikroglia in der Hippokampusformation. Welche Faktoren bei alten Hunden dazu beitragen, dass besonders im Cornu ammonis eine gesteigerte Anzahl an Mikroglia vorliegt, gilt es künftig genauer zu untersuchen. Auch die Wirkung der Mikroglia auf zellulärer Ebene

und ihre Beteiligung an der neuronalen Degeneration sind beim Hund noch nicht hinreichend erforscht.

5.5.2 Unterschiede der Morphologie der Mikroglia zwischen jungen und alten Hunden

Die immunhistochemische Markierung der Mikroglia erlaubte eine zuverlässige Beurteilung des Aktivierungsstadiums (STREIT et al., 2008). In den vorliegenden Ergebnissen lagen bei den jungen Kontrolltieren ohne Proteinpathologie keine Veränderungen der mikroglialen Morphologie vor. Überdies fand sich eine geringfügige bis keine MHC II-Expression, die sich auf die weiße Substanz beschränkte. In der grauen Substanz des frontalen Kortex und in der Hippokampusformation existierten dagegen keine HLA-DR-positiven Zellen. Gleichwohl zeigten Mikroglia bereits im initialen Stadium des CCDS mit Ablagerung von diffusen Plaques in den Gehirnen von Hunden ab 10 Jahren erste morphologische Zeichen einer Aktivierung. Zusätzlich wurde eine Markierung der aktivierten Mikroglia mit dem Antikörper TAL.1B5 vorgenommen, der gegen den humanen Oberflächenrezeptor HLA-DR gerichtet war. Dieser Antikörper erwies sich in einer Studie von TAFTI et al. (1996) als ebenso spezifisch wie ein spezieller anti-Hund-Antikörper. Der Oberflächenrezeptor HLA-DR gehört zu den MHC Klasse II-Rezeptoren, die laut NORDEN & GODBOUT (2013) hoch konserviert sind im Vergleich der Spezies untereinander. HLA-DR diente als Indikator für reaktive Mikroglia (MCGEER et al., 1987). Die reaktive Gliose der Mikroglia gilt als ein Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit (GIULIAN, 1999).

Mikroglia sind auf Grund zahlreicher trophischer Eigenschaften essentiell für die Funktionalität von Neuronen. So ist auch die Aktivierung von Mikroglia per se ein neuronenschutzender Prozess. Als mitotische Zellen unterliegen sie allerdings einer Seneszenz, die zum Verlust vieler Funktionen führt und zur Degeneration von Neuronen beiträgt (NORDEN & GODBOUT, 2013). SAWADA et al. (2008) beschrieben, dass es im Mausmodell zur neuronendegenerativen Parkinson-Erkrankung zu Veränderungen der mikroglialen Eigenschaften kommt. Mit zunehmendem Alter ließen sich vermehrt neurotoxische Effekte beobachten, die regionsspezifisch und abhängig vom Schweregrad der Erkrankung unterschiedlich stark ausgebildet waren. Ursächlich für die Veränderung

der mikroglialen Funktion ist möglicherweise ein altersassoziiertes Ungleichgewicht in den selbst-regulierenden Mechanismen der Zellen (STREIT et al., 2008). Bei alten Menschen und Mäusen gelang der Nachweis einer altersbedingten Modifikation der mikroglial vermittelten Immunantwort (EFFROS, 2001; SHENG et al., 1998; SIERRA et al., 2007). Auch in Gehirnen von alten Ratten zeigten Mikroglia nach Axotomie des Nervus facialis eine wesentlich höhere Proliferationsrate gegenüber Zellen in Gehirnen jüngerer Tiere (CONDE & STREIT, 2006). Bei Hunden ist angesichts der vorliegenden Ergebnisse von einer vergleichbaren Abweichung der mikroglialen Eigenschaften in Abhängigkeit vom Alter und einer gegebenenfalls assoziierten Proteinpathologie auszugehen. In den untersuchten Gehirnen wiesen zwei Hunde mit fehlenden beziehungsweise geringgradigen, disseminiert vorliegenden A β -Ablagerungen ramifizierte Mikroglia auf. Erst ab dem Satou-Stadium 1 fanden sich vereinzelt aktivierte Mikroglia. Vermutlich erfolgt die Aktivierung von Mikroglia durch abnorm gefaltetes A β erst ab einem bestimmten Schwellenwert. Aktivierte Mikroglia fanden sich insbesondere bei Hunden mit den Satou-Stadien 3 und 4. Diese Hunde waren 10 bis 19 Jahre alt. Laut KRABBE et al. (2004) ist eine erhöhte inflammatorische Aktivität ein Charakteristikum des Alterns. Damit einhergehend kommt es zu Beeinträchtigungen einiger regulatorischer Systeme wie den anti-inflammatorisch wirkenden Zytokinen Interleukin (IL-) 10, IL-4 und TGF β sowie den neuronalen Proteinen TREM 2 und Fractalkin (GIULIAN, 1999). KREUTZBERG (1996) postulierte, dass die funktionelle Aktivität der Mikroglia wesentlich mit ihrer Morphologie korreliert. Studien belegten, dass eine mikrogliale Reaktion in Folge eines zentralen oder auch peripheren Stimulus bei alten Individuen übertrieben stattfindet (NORDEN & GODBOUT, 2013). A β -Peptide können dabei eine Aktivierung von Mikroglia mit regional bedingter unterschiedlicher Intensität verursachen. Im Hippokampus wurde beispielsweise eine altersassoziierte Aktivierung der Mikroglia bei Menschen und Makaken nachgewiesen (FINCH et al., 2002). In den Gehirnen der untersuchten Hunde waren insbesondere Mikroglia im frontalen Kortex und Hippokampus verändert. Vergleichsweise wenige aktivierte Mikroglia fanden sich im entorhinalen Kortex. In einer Studie von HWANG et al. (2008) wurden Iba1-markierte Mikroglia im Hippokampus von 2 bis 3 und 10 bis 12 Jahre alten Hunden auf die altersassoziierte Morphologie untersucht. Im Gyrus dentatus lagen veränderte Mikroglia

vor, deren Fortsätze hypertrophiert waren. Zusätzlich ließen sich ein erhöhter Iba1-Proteinlevel und eine gesteigerte Interferon γ -Expression bei den alten Hunden feststellen. Des Weiteren wiesen die Neurone des Hippokampus Zeichen einer Degeneration auf. Diese Studie belegte die altersassoziierte Veränderung der mikroglialen Morphologie im caninen Gehirn, stellte aber keinen Bezug zu einer eventuell vorliegenden Proteinpathologie her.

Die wesentliche Frage, wie das Alter die mikrogliale Funktion beeinflusst, lässt sich kaum anhand gängiger Nagermodelle wie den Tg-APP23-, 3xTg- oder Tg2576-Mäusen zur Alzheimer-Krankheit erforschen. Auf Grund der genetisch bedingten Überexpression des pathologischen A β -Peptids sind diese Tiere bei Ausbruch der Erkrankung mit 6 bis 12 Monaten relativ jung (FINCH et al., 2002; HOCK & LAMB, 2001; ELDER et al., 2010). Des Weiteren existieren widersprüchliche Aussagen zum Einfluss des Alters auf die mikroglial vermittelte Neuroinflammation in Gehirnen alter Nager und der Auswirkung auf die kognitive Leistungsfähigkeit. Mäuse, bei denen medikamentös gegen eine altersassoziierte Neuroinflammation vorgegangen wurde, zeigten bessere Ergebnisse bei Verhaltenstests (JANG et al., 2010). Auch in den Hippokampi von adulten (12 bis 13 Monate) und gealterten (26 bis 28 Monate) F344xBN-Ratten zeigte sich ein Anstieg der Neuroinflammation vermittelnden Rezeptoren wie beispielsweise dem MHC Klasse II-Rezeptor. Allerdings lieferten die Ergebnisse dieser Studie keine Korrelation zwischen dem Ausmaß einer mikroglial vermittelnden Inflammation und der kognitiven Leistungsfähigkeit der Ratten (VANGUILDER et al., 2011). Untersuchungen an Hunden könnten dazu beitragen, den Hund als Modelltier für eine altersassoziierte Veränderung der Mikroglia zu etablieren. Ein weiterer Vorteil des Hundes gegenüber Nagern besteht in der Seneszenz der Mikroglia, die mit der menschlichen Situation vergleichbar ist. Zur Evaluierung, inwieweit sich eine alters- und CCDS-assoziierte Neuroinflammation auf die kognitive Leistungsfähigkeit der Hunde auswirkt, sind weitere Untersuchungen notwendig.

5.5.3 Detektion von dystrophischen Mikroglia in den Gehirnen von alten Hunden

Bisher erfolgte keine Untersuchung des caninen Gehirns auf dystrophisch veränderte Mikroglia. In den untersuchten Gehirnen alter Hunde mit mittel- bis

hochgradiger A β -Pathologie und insbesondere bei Tieren mit Ablagerungen des hyperphosphorylierten Tau-proteins fanden sich dystrophisch veränderte Mikroglia im frontalen und entorhinalen Kortex sowie in der Hippokampusformation. Charakterisiert waren diese Zellen durch bulböse oder perlenschnurartige Auf-treibungen an den Fortsätzen, sowie Verdrillung und Deramifizierung der Zell-fortsätze. Zusätzlich fanden sich Koagula aus zusammengelagerten reaktiven Mikroglia in allen untersuchten Gehirnregionen. Beim Menschen sind diese Koagula der Mikroglia kennzeichnend für Morbus Alzheimer (GIULIAN, 1999). Wahrscheinlich tragen sie zum neuronalen Zelltod und dem Entstehen kogniti-ver Defizite bei alten Hunden bei. Die altersassoziierte Veränderung der Mikroglia stellt dabei sicherlich nicht die Ursache der Erkrankung dar, kann aber durch Modulation der Immunantwort eine mögliche Genesung des Gehirns negativ beeinflussen. Mit dem Nachweis seneszenter Mikroglia in den Gehirnen alter Hunde zeigt sich eine Parallele zu den Mikroglia beim Menschen. STREIT (2004) beschrieb, dass seneszente Mikroglia in ihrer Funktion A β zu beseitigen eingeschränkt sind. Auch ein starker Einfluss des hyperphosphorylierten Tau-proteins auf die Dystrophie der humanen Mikroglia wurde durch STREIT et al. (2009) beschrieben. Auf Grund der limitierten Anzahl von Hunden mit einer Tau-Pathologie ließ sich dieser Aspekt nicht eindeutig klären, obwohl die vorlie-genden Ergebnisse auf einen ähnlichen Zusammenhang in Gehirnen von Hun-den hinweisen. Zukünftig sollte der Hund als Modelltier auch insofern in Be-tracht gezogen werden, als dass die zahlreichen Studien an Mikroglia aus Na-gern unser Wissen über diese Zellspezies im Hinblick auf mögliche weitere Funktionen der Mikroglia im höher entwickelten Gehirn beschränken (KETTENMANN et al., 2011).

5.6 Schlussfolgerungen

Bei der Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit muss beachtet werden, dass eine nicht vorselektierte Population von Hunden untersucht wurde um potentielle Unterschiede des CCDS in Assoziation zu ihrer Größe, dem Gewicht und Alter darzustellen. Das Vorliegen von CCDS mit einer charakteristischen Histopathologie ist beim Hund ebenso variabel wie es für den Men-schen bei Morbus Alzheimer beschrieben wurde (HOLTZMAN et al., 2011). Dieser Umstand kann den direkten Vergleich zwischen einer nicht selektierten

Diskussion

Hundepopulation, bestehend aus Tieren mit und ohne CCDS, mit Daten aus einer selektierten humanen Population mit Morbus Alzheimer beeinträchtigen. Zur Kompensation dieser Einschränkung kann zum Einen eine größere Studienpopulation einbezogen werden oder zum Anderen praktisch anwendbare Verhaltenstests weiterentwickelt werden, die der Detektion von potentiellen Studientieren mit CCDS in tierärztlichen Praxen dienen könnten. Aber auch die Besitzer spielen eine wichtige Rolle, da erste Verhaltensänderungen in der Regel durch diese beobachtet werden (LANDSBERG & ARAUJO, 2005). Vorhandene Tests eignen sich nicht zur Detektion von Haushunden mit CCDS oder zur Beurteilung der Funktionalität von bestimmten Gehirnregionen. Diese sind meist für Tiere unter Laborbedingungen entwickelt worden und teilweise sehr aufwendig beziehungsweise zeitintensiv (MILGRAM et al., 2002; SALVIN et al., 2011; SNIGDHA et al., 2011; COTMAN & HEAD, 2008).

Der demografische Wandel unserer Gesellschaft, der zukünftig zu einem dramatischen Anstieg von Patienten mit Morbus Alzheimer führen wird, verdeutlicht die Dringlichkeit einer Therapie (THAL et al., 2008). Bis zum Jahr 2050 soll sich die Anzahl der Demenzkranken verdoppeln (SÜTTERLIN et al., 2011), wobei die Alzheimer-Krankheit mit 60 – 70 % die häufigste Demenzursache in der westlichen Welt darstellt (JELLINGER, 2001). THAL et al. (2002b; 2008) diskutierten den Vorzug einer Therapie, die den Ausbruch von Morbus Alzheimer verhindert gegenüber einer Behandlung an dementen Patienten mit bereits irreversiblen Schädigungen am Gehirn.

Auf Grund der gesteigerten Lebenserwartung von Haushunden (KRAUS et al., 2013) ist davon auszugehen, dass zukünftig auch in dieser Spezies vermehrt Fälle mit CCDS verzeichnet werden (RICKLEFS, 1998; SARASA & PESINI, 2009). Entsprechend ihrer höheren Lebenserwartung eignen sich besonders kleine und mittelgroße Hunde für histopathologische Studien, da diese, beginnend mit 14 Jahren wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, eine robuste A β -Pathologie ausbilden und es zur Formation von NFTs und neuritischen Plaques im Gehirn dieser Tiere kommen kann. Auf translationaler Ebene könnten Defizite von etablierten Nagermodeilen überwunden werden (Tabelle 5.1). Keines dieser Modelltiere bildet alle neuropathologischen Merkmale von Morbus Alzheimer aus (HÄRTIG et al., 2013; HOCK & LAMB, 2001). Als ein Modelltier für die frühe Form der Alzheimer-Krankheit kann der Hund auch für

die Erforschung des aggressiven und hochgradig zytotoxisch wirkenden pE3A β herangezogen werden und weist als solches gegenüber den etablierten transgenen Nagern wichtige Vorteile auf (Tabelle 5.1). Eine Einschränkung bei der Nutzung von Hunden ergibt sich daraus, dass die Erkrankung im Vergleich zu transgenen Nagern erst relativ spät einsetzt. Dies erschwert den Einsatz von klassischen Versuchsplänen und erfordert veterinärmedizinisch klinische Fälle. Dennoch ermutigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Gebrauch von Hunden für Therapiestudien einer altersassoziierten, dem Morbus Alzheimer ähnlichen Pathologie. Sie bieten eine heterogene und breite Population, die dem variierenden genetischen Hintergrund des Menschen entspricht.

Etwa 90 % der Substanzen, die sich in Nagern als „sicher“ und vielversprechend erwiesen, scheiterten auf Grund unerwarteter Nebenwirkungen bei klinischen Tests am Menschen (DOODY et al., 2013; PATTON et al., 2006). Vereinzelt wurden Hunde bereits für Therapiestudien genutzt (BARONE et al., 2012; COTMAN & HEAD, 2008; POP et al., 2010). Dabei zeigte sich, dass der canine Organismus ähnlich dem des Menschen auf Medikamente reagiert und deren Metabolismus vergleichbar stattfindet (COTMAN & HEAD, 2008).

Seneszenz ist ein komplexer Vorgang und muss als solcher betrachtet und untersucht werden. So beeinflussen auch Umweltfaktoren und die körperliche Fitness (COLCOMBE et al., 2004; FRIEDLAND et al., 2001) wesentlich das Altern und die Ausbildung damit einhergehender Erkrankungen (MASORO, 2006). Eine im Jahr 2000 von VIERA et al. veröffentlichte Studie an *Drosophila melanogaster* zeigte, dass Umweltfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Gene zur Langlebigkeit haben. Hunde, die den gleichen Umweltfaktoren (industrielle Luftverschmutzung, Lichtverschmutzung, Passivrauchen etc.) wie Menschen ausgesetzt werden, sind auch als Modell für diese komplexen Wechselwirkungen prädisponiert.

Tab. 5.1 Vergleichende Analyse der Pathomechanismen

Patho-physiologie	Mensch	Hund	Maus
Ausbruch	altersassoziierte Erkrankung		transgene Modelltiere mit frühreifem Krankheitsausbruch, Transgene ursprünglich von familiärer Form der Alzheimer-Krankheit
Amyloid	Formation von Plaques bestehend aus Pyroglutamat- und nicht-modifiziertem A β		Überexpression von nicht-modifiziertem A β und verminderte Expression von pEA β
Tau	Tau-Pathologie nach Braak-Stadien	selten Tau-Pathologien beobachtet, unabhängig von A β ?	v.a. Modelle mit schwedischer Mutation mit Tau- und A β -Pathologie genutzt
Anatomie	Pathologie im gyrenzephalen Gehirn		Pathologie im lissenzephalen Gehirn
Genetik	heterogene Population mit diversem genetischen Hintergrund		künstlich erzeugte Modelle mit variablen Mutationen
Vorteile	von direkter Relevanz	Untersuchung von klinischen Fällen mit hoher Vergleichbarkeit zum Menschen, dadurch von translationaler Relevanz	einfach handhabbare Spezies mit spezifischem Hintergrund, der Studien zum Einfluss von bestimmten Mutationen erlaubt
Nachteile	Begrenzung auf pathologische Fälle	erschwerter Identifizierung von Fällen mit CCDS erfordert größere Studienpopulationen und weitere Untersuchungen	künstliches Modell von potentiell limitierter translationaler Relevanz

5.7 Ausblick

Die erhobenen Daten unterstützen aktuell die Entwicklung und Testung von Markern für A β und pathologisches Tauprotein mittels Positronen-Emissions-Tomographie. Infolge der starken Similarität zwischen den humanen und caninen Proteinen könnten diese Studien eine frühe Diagnostik der Alzheimer-Krankheit bei menschlichen Patienten fördern.

6 Zusammenfassung

Franziska Schmidt

Morphologie der Mikroglia in Assoziation zu Amyloidablagerungen und Tau-Pathologien im caninen Gehirn

Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im März 2014

(100 Seiten, 37 Abbildungen, 11 Tabellen, 181 Literaturangaben, 4 Anhänge)

Schlüsselwörter: canines kognitives Dysfunktionssyndrom, A β , pE3A β , Plaques, NFT, Mikroglia, Seneszenz, Alzheimer-Krankheit

Altersassoziiert entwickeln Hunde eine Erkrankung, die in vielen Aspekten der Alzheimer-Krankheit des Menschen ähnelt. Das canine kognitive Dysfunktionssyndrom äußert sich klinisch u.a. durch Desorientierung in vertrauter Umgebung, Vergessen von Kommandos und einen gestörten Schlaf-Wach-Rhythmus. Aus der Literatur ist bekannt, dass in den Gehirnen von alten Hunden regelmäßig A β - und selten Tauablagerungen zu beobachten sind. Allerdings erfolgte bisher kein Nachweis des hochgradig zytotoxischen und modifizierten pE3A β . Auch Veränderungen der mikroglialen Morphologie wurden bisher nicht beschrieben.

Insgesamt lagen in dieser Studie 24 euthanasierte Rasse- und Mischlingshunde verschiedenen Alters vor. Fünf dieser Tiere besaßen ein durchschnittliches Alter von 2,1 Jahren und dienten als Kontrollgruppe. Die anderen 19 Hunde waren 8 bis 19 Jahre alt und wurden entsprechend ihrer Größe und des Gewichts in die drei Kategorien kleine (≤ 10 kg), mittelgroße (10 – 25 kg) und große Hunde (> 25 kg) unterteilt. Die Gehirne wurden aus den Schädeln präpariert und in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Präparation des frontalen und entorhinalen Kortex sowie der Hippokampusformation, die in 30%iger Saccharoselösung vitrifiziert und mittels Methylbutan bei -80 °C eingefroren wurden. Von den Regionen wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 40 μ m angefertigt und diese anhand immunhistologischer Färbungen auf das Vor-

Zusammenfassung

handensein von Ablagerungen, bestehend aus den Amyloidsubtypen $A\beta_{8-17}$ und pE3A β , sowie aus hyperphosphorylierten Tau, untersucht. Die Morphologie und das Aktivitätsstadium der Mikroglia wurden mit Antikörpern gegen Iba1 und TAL.1B5 analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Untersuchung anhand des Filament Tracer. Stereologische Analysemethoden wurden zur Quantifizierung der A β -Ablagerungen und der Mikroglia angewandt.

Disseminierte Plaques fanden sich bereits ab 9 Jahren. In den untersuchten Gehirnregionen von alten Hunden zeichnete sich ein progressiver Verlauf der Ablagerungen ab. Da insbesondere kleinere Hunde ein höheres Alter erreichten als mittelgroße und große Hunde konnten in dieser Kategorie vermehrt Plaques beobachtet werden. Den alten Tieren gemein war, dass in den untersuchten Gehirnregionen pE3A β -Plaques häufiger vorlagen als Plaques, die aus $A\beta_{8-17}$ bestanden. Kleinere parenchymale und meningeale Gefäße des frontalen Kortex schienen besonders anfällig gegenüber pE3A β -Ablagerungen zu sein. Im entorhinalen Kortex von kleinen Hunden war die Menge an gefäßassoziierten $A\beta_{8-17}$ - und pE3A β -Ablagerungen annähernd gleich. Bei mittelgroßen und großen Hunden dominierte im entorhinalen Kortex und ventralen Hippokampus die Anzahl an gefäßassoziierten $A\beta_{8-17}$ -Ablagerungen. Bei kleinen Hunden existierten im ventralen Hippokampus signifikant mehr gefäßassoziierte $A\beta_{8-17}$ - als pE3A β -Ablagerungen. Hyperphosphoryliertes Tau fand sich in der Hippokampusformation von drei Hunden im Alter von 11 bzw. 15 Jahren. Der Schweregrad war unterschiedlich ausgeprägt, sodass nur ein Hund eine hochgradige Pathologie mit NFTs und neuritischen Plaques aufwies. Einhergehend mit dem Alter und einer assoziierten Proteinpathologie fanden sich Veränderungen der mikroglialen Morphologie. Neben ramifizierten Mikroglia lagen in den untersuchten Gehirnregionen aktivierte Mikroglia vor. Einige Mikroglia wiesen Zeichen einer Seneszenz auf und waren insbesondere in den Gehirnen von Hunden mit einer hochgradigen A β - bzw. Tau-Pathologie vorhanden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit dieser Studie eine nähere Charakterisierung des caninen kognitiven Dysfunktionssyndroms erfolgte. Die Befunde sind von hoher translationaler Bedeutung und fördern die Etablierung des Hundes als natürliches Modelltier zur Untersuchung von Alterungsprozessen des Gehirns und für die Erforschung des initialen Stadiums der Alzheimer-Krankheit.

7 Summary

Franziska Schmidt

Morphological examination of microglial cells in association to tau and amyloid deposits in the canine brain

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in March 2014

(100 pages, 37 figures, 11 tables, 181 references, 4 appendices)

Keywords: canine cognitive dysfunction syndrome, A β , pE3A β , plaques, NFT, microglia, senescence, Alzheimer's disease

Dogs develop an age-associated cognitive dysfunction syndrome with several aspects resembling Alzheimer's disease. Affected animals show signs of disorientation in their familiar surroundings, dementia, and a disturbed circadian rhythm. The underlying neurodegenerative disease is associated with pathologic changes in the brain including regularly deposition of β -pleated amyloid and rarely hyperphosphorylated tau accumulation. However, there have been no reports of the highly cytotoxic and modified pE3A β in the canine brain. Equally, altered microglial morphology has not been documented so far.

For this study 24 euthanized thoroughbred dogs and mongrels of different ages were available. Five of these animals had an average age of 2.1 years and served as control group. The remaining 19 dogs were 8 to 19 years old. According to their height and weight these dogs were divided into 3 different categories including small (≤ 10 kg), medium (11 - 25 kg) and large dogs (> 25 kg).

Brains were dissected from the skulls and fixed in 4 % paraformaldehyde. Afterwards the frontal and entorhinal cortex as well as the hippocampal formation were isolated, vitrified in 30 % sucrose solution and frozen to -80 °C by methylbutane. These regions were sliced into 40 μ m thick sections and subsequently stained by immunohistology in order to detect deposits of A β_{8-17} , pE3A β and hyperphosphorylated tau, respectively. Antibodies against Iba1 and TAL.1B5 were used to analyze microglial morphology and activation status.

Summary

Additionally further investigations were made with the Filament Tracer of Imaris software. Stereological analysis methods served for the quantification of A β depositions and microglia.

Disseminated A β plaques were detected in dogs from 9 years on. Within the examined brain regions of elderly dogs a progressive course of A β depositions was observed. Especially small dogs had a longer lifespan than medium and large dogs with the result that more plaques were deposited in the brains of small dogs. Elderly dogs had in common that pE3A β -plaques were more often located in the examined brain regions than plaques containing A β_{8-17} . Minor parenchymal and meningeal vessels seemed to be susceptible especially to pE3A β depositions. The amount of vessel-associated A β_{8-17} and pE3A β in the entorhinal cortex of small dogs was almost equal. Within the entorhinal cortex of medium and large dogs the amount of vessel-associated A β_{8-17} predominated. The ventral hippocampus of small dogs showed significantly more vessel-associated A β_{8-17} than pE3A β depositions.

Hyperphosphorylated tau was present in the hippocampal formations of 3 dogs with an age of 11 and 15 years, respectively. The degree of severity varied with the result that only one dog showed a high-grade pathology with development of NFTs and neuritic plaques. Accompanied by age and associated protein pathology altered microglial morphology was detected. Alongside with ramified microglia, activated cells were identified in the examined brain regions. Several microglia showed signs of senescence and were present in the brains of dogs with severe A β and tau pathology.

Summarizing, this study facilitated a further characterization of the canine cognitive dysfunction syndrome. The results are of highly translational importance and encourage the establishment of the dog as a natural animal model for studying age-associated processes and the initial stage of Alzheimer's disease.

8 Literaturverzeichnis

Adrianov O, Mering T. Atlas of the canine brain. 2th Edition. Arlington, Massachusetts, USA: NPP Books; 2010.

Alldinger S, Wünschmann A, Baumgärtner W, Voss C, Kremmer E. Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathol.* 1996;92(3):273-80.

Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin.* 1907;64:146-8.

Armstrong R. β -Amyloid plaques: stages in life history or independent origin? *Dement Geriatr Cogn.* 1998;9(4):227-38.

Armstrong R. The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *Int J Alzheimers Dis.* 2011;630865.

Attems J, Thal D, Jellinger K. The relationship between subcortical tau pathology and Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(4):711-5.

Augustinack J, Schneider A, Mandelkow E-M, Hyman B. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2002;103(1):26-35.

Azkona G, García-Belenguer S, Chacón G, Rosado B, León M, Palacio J. Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. *J Small Anim Pract.* 2009;50(2):87-91.

Bain M, Hart B, Cliff K, Ruehl W. Predicting behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;218(11):1792-5.

Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2011;377:1019-31.

Banati R, Beyreuther K. Alzheimer's disease. In: Kettenmann H, Ransom B, Hrsg. *Neuroglia.* New York, Oxford: Oxford University Press; 1995. p. 1027-43.

Barone E, Mancuso C, Di Domenico F, Sultana R, Murphy MP, Head E, Butterfield DA. Biliverdin reductase-A: a novel drug target for atorvastatin in a

dog pre-clinical model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2012;120(1):135-46.

Bauer J, Ruuls S, Huitinga I, Dijkstra C. The role of macrophage subpopulations in autoimmune disease of the central nervous system. *Histochem J.* 1996;28(2):83-97.

Bernedo V, Insua D, Suárez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P. Beta-amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the dog. *J Comp Neurol.* 2009;513(4):417-29.

Blinzinger K, Kreutzberg G. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1968;85(2):145-57.

Borràs D, Ferrer I, Pumarola M. Age-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol.* 1999;36(3):202-11.

Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett.* 1986;65(3):351-5.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59.

Braak E, Braak H, Mandelkow E. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol.* 1994;87:554-67.

Braak H, Thal D, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2011;70(11):960-9.

Casserly I, Torpol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, misfolded proteins. *Lancet.* 2004;363:1139-46.

Colcombe S, Kramer AF, Erickson KI, Scalf P, McAuley E, Cohen NJ, Webb A, Jerome GJ, Marquez DX, Elavsky S. Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:3316-21.

Colle M-A, Hauw J-J, Crespeau F, Uchihara T, Akiyama H, Checler F, Pageat P, Duykaerts C. Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: correlation with behavior. *Neurobiol Aging.* 2000;21(5):695-704.

Conde J, Streit W. Effect of aging on the microglial response to peripheral nerve injury. *Neurobiol Aging*. 2006;2(10):1451-61.

Cotman C, Head E. The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. *J Alzheimers Dis*. 2008;15(4):685-707.

Cui Y, Le Y, Yazawa H, Gong W, Wang JM. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol*. 2002;72(4):628-35.

Cummings B, Su JH, Cotman CW, White R, Russell MJ. Beta-amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1993;14(6):547-60.

Cummings B, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging*. 1996a;17(2):259-68.

Cummings B, Satou T, Head E, Milgram NW, Cole GM, Savage MJ, Podlisny MB, Selkoe DJ, Siman R, Greenberg BD, Cotman CW. Diffuse plaques contain C-terminal A beta 42 and not A beta 40: evidence from cats and dogs. *Neurobiol Aging*. 1996b;17(4):653-9.

Czasch S. Untersuchung über das Auftreten seniler Plaques und einer assoziierten Gliazellaktivierung im Gehirn alter Hunde [Dissertation med. vet.]. Gießen: Universität Gießen; 2001.

Czasch S, Paul S, Baumgärtner W. A comparison of immunohistochemical and silver staining methods for the detection of diffuse plaques in the aged canine brain. *Neurobiol Aging*. 2006;27(2):293-305.

D'Andrea M, Cole G, Ard M. The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain. *Neurobiol Aging*. 2004;25(5):675-83.

Davis E, Foster T, Thomas W. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull*. 1994;34(1):73-8.

Deane R, Du Yan S, Subramanyan RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*. 2003;9(7):907-13.

Del Rio-Hortega P. Microglia. In: Penfield W., Hrsg. Cytology and cellular pathology of the nervous system. New York: Hoeber; 1932. p. 482-534.

Delaère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ. Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol.* 1991;81(3):328-35.

Dickson D, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C. Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia.* 1993;7(1):75-83.

Doody R, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R, Semagacestat Study Group. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2013;369(4):341-50.

Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Schmidt AM. Amyloid-beta peptide receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(10):5296-301.

Du Y, Dodel RC, Eastwood BJ, Bales KR, Gao F, Lohmuller F, Muller U, Kurz A, Zimmer R, Evans RM, Hake A, Gasser T, Oertel WH, Griffin WS, Paul SM, Farlow RM. Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology.* 2000;55(4):480-3.

Effros R. Immune system activity. In: Masoro E, Austad S., Hrsg. Handbook of the biology of aging. 5th Edition. San Diego: Academic Press; 2001. p. 324-350.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature.* 1996;382(6593):716-19.

El Khoury J, Luster A. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(12):626-32.

Elder G, Gama Sosa M, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010;77(1):69-81.

Finch C, Morgan TE, Rozovsky I, Xie Z, Weindruch R, Prolla T. Microglia and aging in the brain. In: Streit W, Hrsg. Microglia in the regenerating and degenerating central nervous system. New York: Springer Verlag; 2002. p. 275-305.

Literaturverzeichnis

Flanary B, Streit W. Telomeres shorten with age in rat cerebellum and cortex in vivo. *J Anti Aging Med.* 2003;6(4):299-308.

Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Wisniewski HM, Potempska A, Carroll RT, Emmerling MR, Kim KS. Secretion and accumulation of Alzheimer's beta-protein by cultured vascular smooth muscle cells from old and young dogs. *Brain Res.*1995;676(1):225-30.

Friedland R, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, Petot GJ, Debanne SM. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Aca Sci USA.* 2001;98(6):3440-5.

Fuller G, Burger P. Central Nervous System. In: Mills SE, Hrsg. *Histology for Pathologists.* 3th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2007. p. 273-319.

Galis F, Van der Sluijs I, Van Dooren TJ, Metz JA, Nussbaumer M. Do large dogs die young? *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2007;308(2):119-26.

Giaccone G, Verga L, Finazzi M, Pollo B, Tagliavini F, Frangione B, Bugiani O. Cerebral preamyloid deposits and congophilic angiopathy in aged dogs. *Neurosci Lett.* 1990;114(2):178-83.

Giulian D. Microglia and the immune pathology of Alzheimer Disease. *The Am J Hum Genet.* 1999;65(1):13-8.

Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett.* 1995;189(3):167-9.

González-Soriano J, Marín García P, Contreras-Rodríguez J, Martínez-Sainz P, Rodríguez-Veiga E. Age-related changes in the ventricular system of the dog brain. *Ann Anat.* 2001;183(3):283-91.

Graeber M. Changing face of microglia. *Science.* 2010;330(6005):783-8.

Greer K, Canterbury S, Murphy K. Statistical analysis regarding the effects of height and weight on life span of the domestic dog. *Res Vet Sci.* 2007;82(2):208-14.

Grossmann R, Stence N, Carr J, Fuller L, Waite M, Dailey ME. Juxtavascular microglia migrate along brain microvessels following activation during early postnatal development. *Glia.* 2002;37(3):229-40.

Literaturverzeichnis

Gruys E. Protein folding pathology in domestic animals. *J Zhejiang Univ Sci.* 2004;5(10):1226-38.

Gunn A, Masters C, Cherny R. Pyroglutamate-A β : role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(12):1915-18.

Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):a006270.

Härtig W, Klein C, Brauer K, Schüppel K-F, Arendt T, Brückner G, Bigl V. Abnormally phosphorylated protein tau in the cortex of aged individuals of various mammalian orders. *Acta Neuropathol.* 2000;100(3):305-12.

Härtig W, Klein C, Brauer K, Schüppel KF, Arendt T, Bigl V, Brückner G. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol Aging.* 2001;22(1):25-33.

Härtig W, Saul A, Kacza J, Grosche J, Goldhammer S, Michalski D, Wirths O. Immunolesion-induced loss of cholinergic projection neurons promotes β -amyloidosis and tau hyperphosphorylation in the hippocampus of triple-transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013. doi: 10.1111/nan.12050.

Hartlage-Rübsamen M, Morawski M, Waniek A, Jäger C, Zeitschel U, Koch B, Cynis H, Schilling S, Schliebs R, Demuth HU, Rossner S. Glutaminyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu-) A β deposits in hippocampus via distinct cellular mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2011;121(6):705-19.

Head E, McCleary R, Hahn FF, Milgram NW, Cotman CW. Region-specific age at onset of beta-amyloid in dogs. *Neurobiol Aging.* 2000;21(1):89-96.

Head E. Brain aging in dogs: parallels with human brain aging and Alzheimer's disease. *Vet Ther.* 2001;2(3):247-60.

Head E, Pop V, Sarsoza F, Kaye R, Beckett TL, Studzinski CM, Tomic JL, Glabe CG, Murphy MP. Amyloid beta-peptide and oligomers in the brain and cerebrospinal fluid of aged canines. *J Alzheimers Dis.* 2010;20(2):637-46.

Head E. Neurobiology of the aging brain. *Age (Dordr).* 2011;33(3):485-96.

Hock B, Lamb B. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Genet.* 2001;17(10):S7-S12.

Holtzman D, Morris J, Goate A. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* 2011;3(77):77sr1.

Literaturverzeichnis

Hou Y, White RG, Bobik M, Marks JS, Russell MJ. Distribution of beta-amyloid in the canine brain. *Neuroreport* 1997;8(4):1009-12.

Hwang I, Lee CH, Li H, Yoo KY, Choi JH, Kim DW, Kim DW, Suh HW, Won MH. Comparison of ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity of the hippocampal dentate gyrus and CA1 region in adult and aged dogs. *Neurochem Res.* 2008;33(7):1309-15.

Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(3):855-62.

Insua D, Suárez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P. Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. *Neurobiol Aging.* 2010;31(4):625-35.

Insua D, Corredoira A, González-Martínez A, Suárez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P. Expression of p75(NTR), a marker for basal forebrain cholinergic neurons, in young and aged dogs with or without cognitive dysfunction syndrome. *J Alzheimers Dis.* 2012;28(2):291-6.

Jang S, Dilger R, Johnson R. Luteolin inhibits microglia and alters hippocampal-dependent spatial working memory in aged mice. *J Nutr.* 2010;140(10):1892-98.

Jawhar S, Wirths O, Bayer TA. Pyroglutamate amyloid- β (A β): a hatchet man in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2011;286(45):38825-32.

Jellinger K. Neuropathologie der Demenzen. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;2(1):7-31.

Johnstone EM, Chaney MO, Norris FH, Pascual R, Little SP. Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991;10(4):299-305.

Jolly RD, Palmer DN, Studdert VP, Sutton RH, Kelly WR, Koppang N, Dahme G, Hartley WJ, Patterson JS, Riis RC. Canine ceroid-lipofuscinoses: a review and classification. *JSAP.* 1994;35(6):299-306.

Kettenmann H, Hanisch U, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91(2):461-553.

Literaturverzeichnis

- Keuker J, Vollman-Honsdorf G, Fuchs E. How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Res Protoc.* 2001;7(3):211-21.
- Kitamoto T, Ogomori K, Prusiner S. Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest.* 1987;57(2):230-6.
- Krabbe K, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol.* 2004;39(5):687-99.
- Kraus C, Pavard S, Promislow D. The size-life span trade-off decomposed: why large dogs die young. *Am Nat.* 2013;181(4):492-505.
- Kreutzberg G. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):312-8.
- Landsberg G, Araujo J. Behavior problems in geriatric pets. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;35(3):675-98.
- Lawson L, Perry V, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 1990;39(1):151-70.
- Long J, Kalehua AN, Muth NJ, Calhoun ME, Jucker M, Hengemihle JM, Ingram DK, Mouton PR. Stereological analysis of astrocyte and microglia in aging mouse hippocampus. *Neurobiol Aging.* 1999;19(5):497-503.
- Luo X, Ding J, Chen S. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2010;5:12. doi: 10.1186/1750-1326-5-12
- Mackic J, Bading J, Ghiso J, Walker L, Wisniewski T, Frangione B, Zlokovic BV. Circulating amyloid-beta peptide crosses the blood-brain barrier in aged monkeys and contributes to Alzheimer's disease lesions. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(6):303-13.
- Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow E-M. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2007;17(1):83-90.
- Masoro E. Are age-associated diseases an intergral part of aging? In: Masoro E, Austad S, Hrsg. *Handbook of the biology of aging.* 6th Edition. Burlington, MA, USA: Academic Press; 2006. p. 43-62.

Literaturverzeichnis

- McGeer P, Itagaki S, Boyes B, McGeer E. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett*. 1987;79(1-2):195-200.
- McGeer P, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia*. 1993;7(1):84-92.
- Milgram NW, Head E, Muggenburg B, Holowachuk D, Murphey H, Estrada J, Ikeda-Douglas CJ, Zicker SC, Cotman CW. Landmark discrimination learning in the dog: effects of age, an antioxidant fortified food, and cognitive strategy. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(6):679-95.
- Miller R, Austad S. Growth and aging: Why do big dogs die young? In: E. Masoro E, Austad S, Hrsg. *Handbook of the biology of aging*. 6th Edition. Burlington, MA, USA: Academic Press; 2006. p. 512-33.
- Miyawaki K, Nakayama H, Nakamura S, Uchida K, Doi K. Three-dimensional structures of canine senile plaques. *Acta Neuropathol*. 2001;102(4):321-8.
- Morsch R, Simon W, Coleman P. Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58(2):188-97.
- Nakayama H, Kiatipattanasakul W, Nakamura S, Miyawaki K, Kikuta F, Uchida K, Kuroki K, Makifuchi T, Yoshikawa Y, Doi K. Fractal analysis of senile plaques observed in various animal species. *Neurosci Lett*. 2001;297(3):195-8.
- Nakayama H, Uchida K, Doi K. A comparative study of age-related brain pathology - are neurodegenerative diseases present in nonhuman animals? *Med Hypotheses*. 2004;63(2):198-202.
- Neilson J, Hart B, Cliff K, Ruehl W. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *JAVMA*. 2001;218(11):1787-91.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*. 2009;132(Pt 2):288-95.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen K. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314-8.
- Norden D, Godbout J. Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013;39(1):19-34.

Literaturverzeichnis

Nuntagij P, Oddo S, LaFerla FM, Kotchabhakdi N, Ottersen OP, Torp R. Amyloid deposits show complexity and intimate spatial relationship with dendrosomatic plasma membranes: an electron microscopic 3D reconstruction analysis in 3xTg-AD mice and aged canines. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(2):315-23.

Nussbaum J, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Rönicke R, Reymann K, Hutter-Paier B, Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Glabe CG, Demuth HU, Bloom GS. Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta. *Nature.* 2012;485(7400):651-5.

Papaioannou N, Tooten PC, van Ederen AM, Bohl JR, Rofina J, Tsangaris T, Gruys E. 2001 Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. *Amyloid.* 2001;8(1):11-21.

Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, Heun R. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1999;45(5):666-8.

Pascale CL, Miller MC, Chiu C, Boylan M, Caralopoulos IN, Gonzalez L, Johanson CE, Silverberg GD. Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is age-dependent. *Fluids Barriers CNS.* 2011;8:21 doi: 10.1186/2045-8118-8-21.

Patronek G, Waters D, Glickman L. Comparative longevity of pet dogs and humans: implications for gerontology research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1997;52(3):B171-8.

Patton RL, Kalback WM, Esh CL, Kokjohn TA, Van Vickle GD, Luehrs DC, Kuo YM, Lopez J, Brune D, Ferrer I, Masliah E, Newel AJ, Beach TG, Castaño EM, Roher AE. Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: a biochemical analysis. *Am J Pathol.* 2006;169(3):1048-63.

Pekcec A, Baumgärtner W, Bankstahl JP, Stein VM, Potschka H. Effect of aging on neurogenesis in the canine brain. *Aging Cell.* 2008;7(3):368-74.

Perlmutter L. Microvascular pathology and vascular basement membrane components in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 1994;9(1-3):33-40.

Literaturverzeichnis

Perry V, Matyszak M, Fearn S. Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*. 1993;7(1):60-7.

Pimplikar S. Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(6):1261-8.

Pocock J, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci*. 2007;30(10):527-35.

Pop V, Head E, Hill MA, Gillen D, Berchtold NC, Muggenburg BA, Milgram NW, Murphy MP, Cotman CW. Synergistic effects of long-term antioxidant diet and behavioral enrichment on beta-amyloid load and non-amyloidogenic processing in aged canines. *J Neurosci*. 2010;30(29):9831-9.

Pugliese M, Mascort J, Mahy N, Ferrer I. Diffuse beta-amyloid plaques and hyperphosphorylated tau are unrelated processes in aged dogs with behavioral deficits. *Acta Neuropathol*. 2006;112(2):175-183.

Pugliese M, Gangitano C, Ceccariglia S, Carrasco JL, Del Fà A, Rodríguez MJ, Michetti F, Mascort J, Mahy N. Canine cognitive dysfunction and the cerebellum: acetylcholinesterase reduction, neuronal and glial changes. *Brain Res*. 2007;1139:85-94.

Ricklefs R. Evolutionary theories of aging: confirmation of a fundamental prediction, with implications for the genetic basis and evolution of life span. *Am Nat*. 1998;152(1):24-44.

Rofina J, van Andel I, Van Ederen AM, Papaioannou N, Yamaguchi H, Gruys E. Canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type: amyloid plaques near capillaries but lack of spatial relationship with activated microglia and macrophages. *Amyloid*. 2003;10(2):86-96.

Rofina J, Singh K, Skoumalova-Vesela A, van Ederen AM, van Asten AJAM, Wilhelm J, Gruys E. Histochemical accumulation of oxidative damage products is associated with Alzheimer-like pathology in the canine. *Amyloid*. 2004;11(2):90-100.

Rofina J, van Ederen AM, Toussaint MJ, Secrève M, van der Spek A, van der Meer I, Van Eerdenburg FJ, Gruys E. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2006;1069(1):216-26.

Rollo C. Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evol Dev*. 2002;4(1):55-61.

Literaturverzeichnis

Salvin H, McGreevy P, Sachdev P, Valenzuela M. The canine sand maze: an appetitive spatial memory paradigm sensitive to age-related change in dogs. *J Exp Anal Behav.* 2011;95(1):109-18.

Sarasa M, Pesini P. Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2009;6(2):171-8.

Sarasa L, Gallego C, Monleón I, Olvera A, Canudas J, Montañés M, Pesini P, Sarasa M. Cloning, sequencing and expression in the dog of the main amyloid precursor protein isoforms and some of the enzymes related with their processing. *Neuroscience.* 2010;171(4):1091-101.

Satou T, Cummings BJ, Head E, Nielson KA, Hahn FF, Milgram NW, Velazquez P, Cribbs DH, Tenner AJ, Cotman CW. The progression of beta-amyloid depositions in the frontal cortex of the aged canine. *Brain Res.* 1997;774(1-2):35-43.

Sawada M, Sawada H, Nagatsu T. Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis.* 2008;5(3-4):254-6.

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 HU, Rossner S. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med.* 2008;14(10):1106-11.

Schnell S, Staines W, Wessendorf M. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(6):719-30.

Selkoe DJ, Bell DS, Podlisny MB, Price DL, Cork LC. Conservation of brain amyloid proteins in aged mammals and humans with Alzheimer's disease. *Science.* 1987;235(4791):873-3.

Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(19):7341-5.

Sheng J, Mrak R, Griffin W. Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathol.* 1998;95(3):229-34.

Sierra A, Gottfried-Blackmore A, McEwen B, Bulloch K. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia*. 2007;55(4):412-24.

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4): 483-95.

Siwak C, Tapp P, Milgram N. Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the Beagle dog. *Learn Mem*. 2001;8(6):317-25.

Snigdha A, Christie LA, De Rivera C, Araujo JA, Milgram NW, Cotman CW. Age and distraction are determinants of performance on a novel visual search task in aged Beagle dogs. *Age*. 2011;34(1):67-73.

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. 2010;5(3):e9505.

Stein V, Czub M, Hansen R, Leibold W, Moore PF, Zurbriggen A, Tipold A. Characterization of canine microglial cells isolated ex vivo. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004;99(1-2):73-85.

Stein V, Baumgärtner W, Kreienbrock L, Zurbriggen A, Vandeveld M, Tipold A. Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function?. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006;113(3-4):277-87.

Stoffel M. Funktionelle Neuroanatomie für die Tiermedizin. 1. Aufl. Stuttgart, Deutschland: Enke; 2011.

Streit W. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 2002;40(2):133-9.

Streit W. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res*. 2004;77(1):1-8.

Streit W, Sammons N, Kuhns A, Sparks D. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*. 2004a;45(2):208-12.

Streit W, Mrak R, Griffin W. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J. Neuroinflammation*. 2004b;1:14.

Literaturverzeichnis

Streit W. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci.* 2006;29(9):506-10.

Streit W, Miller K, Lopes K, Njie E. Microglial degeneration in the aging brain - bad news for neurons? *Front Biosci.* 2008;13:3423-38.

Streit W, Braak H, Xue Q, Bechmann I. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009;118(4):475-85.

Su M-Y, Head E, Brooks WM, Wang Z, Muggenburg BA, Adam GE, Sutherland R, Cotman CW, Nalcioglu O. Magnetic resonance imaging of anatomic and vascular characteristics in a canine model of human aging. *Neurobiol Aging.* 1998;19(5):479-85.

Sütterlin S, Hoßmann I, Klingholz R. Demenz-Report. Berlin: Berlin Institut für Bevölkerung und Entwicklung; 2011.

Tafti M, Nishino S, Aldrich MS, Liao W, Dement WC, Mignot E. Major histocompatibility class II molecules in the CNS: increased microglial expression at the onset of narcolepsy in a canine model. *J Neurosci.* 1996;16(15):4588-95.

Tapp PD, Siwak CT, Gao FQ, Chiou JY, Black SE, Head E, Muggenburg BA, Cotman CW, Milgram NW, Su MY. Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging. *J Neurosci.* 2004;24(38):8205-13.

Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002a ;61(3):282-93.

Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of Abeta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology.* 2002b;58(12):1791-1800.

Thal DR, Braak H. Postmortale Diagnosestellung bei Morbus Alzheimer. *Der Pathologe.* 2005;26(3):201-13.

Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H. The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2006;6:re1.

Thal DR, Griffin W, Braak H. Parenchymal and vascular Abeta-deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2008;12(5B):1848-62.

Torp R, Head E, Milgram NW, Hahn F, Ottersen OP, Cotman CW. Ultrastructural evidence of fibrillar beta-amyloid associated with neuronal membranes in behaviorally characterized aged dog brains. *Neurosci.* 2000;96(3):495-506.

Tryfonidou M, Holl MS, Vastenburger M, Oosterlaken-Dijksterhuis MA, Birkenhäger-Frenkel DH, van den Brom WE, Hazewinkel HA. Hormonal regulation of calcium homeostasis in two breeds of dogs during growth at different rates. *J Anim Sci.* 2003;81(6):1568-80.

Uchida K, Kuroki K, Yoshino T, Yamaguchi R, Tateyama S. Immunohistochemical study of constituents other than beta-protein in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 1997;93(3):277-84.

VanGuilder HD, Bixler GV, Brucklacher RM, Farley JA, Yan H, Warrington JP, Sonntag WE, Freeman WM. Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment. *J Neuroinflammation.* 2011;8:138.

Verkhratsky A, Butt A. *Glial Neurobiology.* 1. Aufl. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2007.

Viera C, Pasyukova EG, Zeng ZB, Hackett JB, Lyman RF, Mackay TF. Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 2000;154(1):213-27.

Vinters H, Pardridge W, Secor D, Ishii N. Immunohistochemical study of cerebral amyloid angiopathy. II. Enhancement of immunostaining using formic acid pretreatment of tissue sections. *Am J Pathol.* 1988;133(1):150-62.

Virchow R. Über das granuliertes Aussehen der Wandungen des Gehirnventricels. *Zeitschrift für Psychiatrie.* 1846;2:242-48.

von Bernhardi R, Eugenin J. Microglial reactivity to beta-amyloid is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. *Brain Res.* 2004;1025(1-2):186-93.

von Braunmühl A. Kongophile Angiopathie und senile Plaques bei greisen Hunden. *Arch Psychiatr Nervenkr.* 1956;194(4):395-414.

Literaturverzeichnis

Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*. 2009;29(13):3974-80.

Wegiel J, Wisniewski HM, Dziwiatkowski J, Tarnawski M, Nowakowski J, Dziwiatkowska A, Soltysiak Z. The origin of amyloid in cerebral vessels of aged dogs. *Brain Res*. 1995;705(1-2):225-34.

Wegiel J, Wisniewski H, Soltysiak Z. Region- and cell-type-specific pattern of tau phosphorylation in dog brain. *Brain Res*. 1998;802(1-2):259-66.

Wilcock D, Gordon M, Morgan D. Quantification of cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques with Congo red histochemical stain. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1591-5.

Wirhth O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA. Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett*. 2001;306(1-2):116-20.

Wisniewski T, Lalowski M, Bobik M, Russell M, Strosznajder J, Frangione B. Amyloid beta 1-42 deposits do not lead to Alzheimer's neuritic plaques in aged dogs. *Biochem J*. 1996;313(Pt 2):575-80.

Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Harigaya Y. Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol*. 1988;77(2):113-9.

Yamaguchi H, Nakazato Y, Shoji M, Takatama M, Hirai S. Ultrastructure of diffuse plaques in senile dementia of the Alzheimer type: comparison with primitive plaques. *Acta Neuropathol*. 1991;82(1):13-20.

Yamaguchi H, Maat-Schieman ML, van Duinen SG, Prins FA, Neeskens P, Natté R, Roos RA. Amyloid beta protein (Abeta) starts to deposit as plasma membrane-bound form in diffuse plaques of brains from hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type, Alzheimer disease and nondemented aged subjects. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(8):723-32.

Yu CH, Song GS, Yhee JY, Kim JH, Im KS, Nho WG, Lee JH, Sur JH. Histopathological and immunohistochemical comparison of the brain of human patients with Alzheimer's disease and the brain of aged dogs with cognitive dysfunction. *J Comp Pathol*. 2011;145(1):45-58.

Literaturverzeichnis

Zachary J. Central nervous system (CNS). In: P. Rudolph, Hrsg. Pathologic basis of veterinary disease. 5th Edition. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby; 2012. p. 795-839.

Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E-M. Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous tau into dendrites, tau phosphorylation, and destruction of microtubuli and spines. J Neurosci. 2010;30(36):11938-50.

9 Anhang

9.1 Tabellarische Übersichten zu den Studentieren

Tab. 9.1: Fallübersicht mit Anamnese

11	Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Kategorie	Anamnese
1	Beagle	2	♂	Ko	o.b.B.
2	Beagle	2	♂	Ko	Monorchismus
3	Beagle	2	♂	Ko	o.b.B.
4	Beagle	2	♂	Ko	Ventrikelseptumdefekt
5	Beagle	2.58	♂	Ko	o.b.B.
6	West Highland White Terrier	8	♂	S	na
7	Labrador Retriever	9	♀	L	o.b.B.
8	Mischlingshund	10	♀	M	viszerale Tumoren
9	Irischer Setter	11	♂	L	na
10	Berner Sennenhund	11,5	♀	L	zeitweise Verwirrung, multiple Tumoren der inneren Organe
11	Kuvasz	13	♀	L	na
12	Deutscher Schäferhund	13,5	♂	L	na
13	Sheltie-Mischling	14	♂	S	Blindheit, teilweise Orientierungslosigkeit, apathisch
14	Amerikanischer Staffordshire Terrier	14	♂	M	na
15	Pit Bull	14	♂	M	na

Anhang

16	Pekinese	15	♂	S	Stupor, Verwirrung, Orientierungslosigkeit in familiärer Umgebung, Beeinträchtigung des motorischen und vestibulären Systems, erhöhte Leberwerte
17	Pudel	15	♀	S	Kardiomyopathie
18	Mischlingshund	15	♀	M	na
19	Mischlingshund	16	♂	L	na
20	Rauhaardackel	16	♀	S	Aktive Inkontinenz, Orientierungslosigkeit, Störungen der Wahrnehmung, Beeinträchtigungen des motorischen Systems, Kardiomyopathie, Mammatumor
21	Spitzmischling	16	♀	S	na
22	Terriermischling	16	♂	M	na
23	Mischlingshund	18	♂	M	na
24	Malteser	19	♂	S	na

Tab. 9.2: Einteilung der A β -Pathologie gemäß den Satou-Stadien

Satou-Stadium	Anzahl Tiere	Fälle
0	6	1 - 6
1	6	7, 9, 11, 15, 16, 18
2	2	22, 23
3	6	8, 12, 13, 14, 20, 24
4	4	10, 17, 19, 21

9.2 Protokoll der H&E-Färbung

- | | | |
|-----|--|-------------|
| 1. | Waschen der Schnitte in 1 x PBS | 15 Minuten |
| 2. | Aufziehen der Schnitte auf Superfrost® Plus Objektträger | |
| 3. | Überschüssiges PBS abtropfen lassen und Schnitte bei Raumtemperatur lufttrocknen | über Nacht |
| 4. | Rehydratation der Schnitte in Aqua dest. | 30 Sekunden |
| 5. | Inkubation der Schnitte in Hämatoxylinlösung | 4 Minuten |
| 6. | Spülen der Schnitte in Leitungswasser | 30 Sekunden |
| 7. | Bläuen der Schnitte in Leitungswasser | 5 Minuten |
| 8. | Inkubation in Eosinlösung | 4 Minuten |
| 9. | Spülen in Aqua dest. | 30 Sekunden |
| 10. | Lufttrocknen der Schnitte | 10 Minuten |
| 11. | Überführen der Schnitte in 96%iges Ethanol | 2 Minuten |
| 12. | Schnitte bei Raumtemperatur trocknen lassen | |
| 13. | Inkubation in Rotihistol | 5 Minuten |
| 14. | Eindecken der Schnitte mit Roti®-Histokitt | |

9.3 Übersicht einzelner Ergebnisse des humanen Gewebes

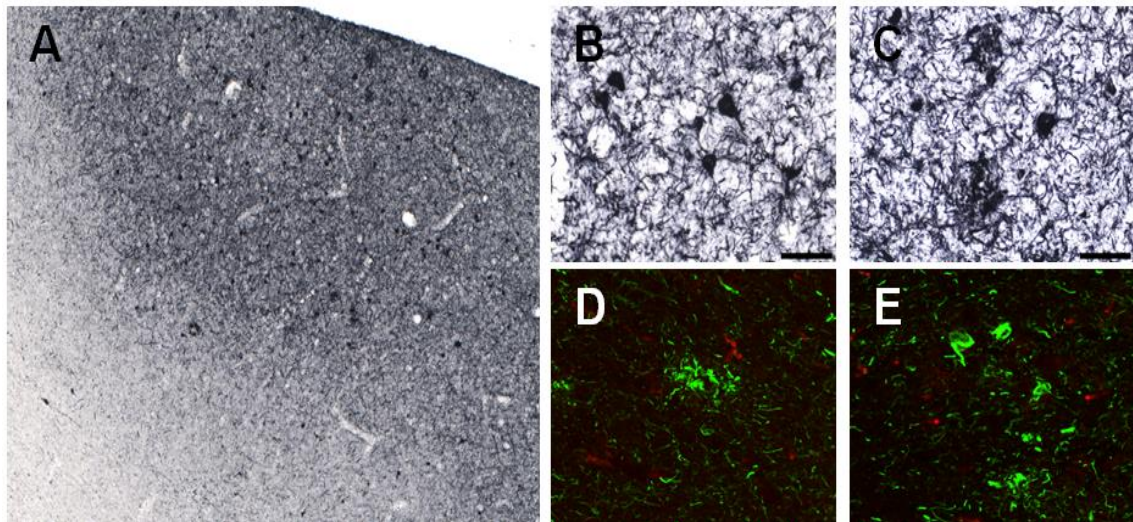


Abb. 9.1: Pathologie des Braak-Stadiums VI

Autoptisches Material eines Alzheimer-Patienten, bei dem hyperphosphoryliertes Tau mittels Immunhistologie (A - C) und Immunfluoreszenz (D - E) markiert wurde. Die humanen Proben dienen als Positivkontrolle. A) Tau-Pathologie im Brodman Areal 7. B) NFTs (Pfeilspitzen) und C) neuritische Plaques (Pfeile) im parietalen Kortex. D) Fluoreszenzfärbung der neuritischen Plaques und E) der NFTs. Maßstabsbalken: 200 µm (A); 50 µm (B, C). 20fache Vergrößerung in D und E.

9.4 Tabellarische Übersichten der verwendeten Materialien

Tab. 9.3: Reagenzien und Materialien

Reagenz	Spezifizierung	Hersteller
Ameisensäure	98%ig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Deckgläschen		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin	Pulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	in Toluol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin		Dr. K. Hollborn und Söhne GmbH und Co. KG, Leipzig, Deutschland
Ethanol	98%ig	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Anhang

Glyceringelatine		Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Filterpapier	114V	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylinlösung nach Gill II		Dr. K. Hollborn und Söhne GmbH und Co. KG, Leipzig, Deutschland
KongoRot		Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Menzel-Objektträger	unbeschichtet	ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Methanol	98%ig, absol.	VWR BDH Prolabo [®] , Geldenaaksebaan, Belgien
Methylbutan		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Milchpulver		Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid		Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	45 %, reinst	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nickelammoniumsulfat		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Pulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PBS		Gibco [®] Life Technologies [™] , Darmstadt, Deutschland
Rotihistol		Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti [®] -Histokitt		Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Röhrchen	15 ml/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Saccharose	Pulver	VWR BDH Prolabo [®] , Geldenaaksebaan, Belgien

Anhang

Sudanschwarz B		Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Toluol		Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Tris-Borat-EDTA-Puffer	Pulver	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween®20		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid	30%ig	VWR BDH Prolabo®, Briare, Frankreich
Zellkulturplatte	24 Kavitäten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 9.4: Antikörper und Seren

Antigen	Klonalität und Spezifität	Isotyp	Konjugat	Hersteller
<i>Primäre Antikörper</i>				
β-Amyloid (Aβ ₈₋₁₇)	Monoklonal (Klon 6F3D), Maus-anti-Human	IgG1	-	Dako Cytomation , Glostrup, Dänemark
Anti-Aβ-pE3	Monoklonal (Klon 2-48), Maus-anti-pyro-Glu Aβ	IgG1	-	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Phospho- PHF-Tau pSer202 / pThr205	Monoklonal (Klon AT8), Maus-anti-Human	IgG1	-	ThermoFisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Iba1	Polyklonal, Kaninchen-anti-Iba1	-	-	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland
HLA-DR- Antigen, Alpha-Chain	Monoklonal (Klon TAL.1B5), Maus-anti-Human	IgG1	-	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

Anhang

<i>Sekundäre Antikörper</i>				
-	Esel-anti-Maus	IgG	Biotin	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
-	Esel-anti-Kaninchen	IgG	Biotin	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
-	Esel-anti-Kaninchen	IgG	Cy3 bis-NHS Ester	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
-	Esel-anti-Maus	IgG	Alexa Fluor® 488 Carbonsäure	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
<i>Tertiärantikörper</i>				
Peroxidasegekoppeltes Extravidin	-	-	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Seren</i>				
Esel Normalserum	-	-	-	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Bovines Serumalbumin	-	-	-	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Anhang

Tab. 9.5: Laborgeräte und Software

Name	Ausführung	Firma
Bildanalyse	Imaris 7.6.1	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
Bildverarbeitung	SpotAdvanced™ modular imaging software	Spot Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse Ti-E	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Kamera	Spot insight mono-chrome camera	Spot Imaging Solutions, Sterling Heights, MI, USA
Hirnmesser	16 cm, 20 cm	Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen/Tuttlingen, Deutschland
Kühlschrank	4 °C	Liebherr GmbH, Biberbach an der Riss, Deutschland
Kühlschrank	-20 °C	Liebherr GmbH, Biberbach an der Riss, Deutschland
Kühlschrank	-80 °C	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Kryostat-Mikrotom	Leica CM3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM 510 Meta	Carls Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	Zeiss AxioPhot	Carls Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop zur Stereologie	Zeiss Axio Imager.D1	Carls Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Plattformschüttler	Duomax 1013	Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Skalpellgriff	Nr. 3	KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Skalpellklingen	Nr. 10	KLS Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Anhang

Stereologie	Stereo Investigator 8	MBF Bioscience, Williston, VT, USA
Statistikprogramm	Sigma Plot 12.0	Systat Software Inc., Chicago, IL, USA

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Spaltungswege des APP	6
Abb. 2.2:	Schematische Darstellung der verschiedenen A β -Plaques	9
Abb. 2.3:	Hypothese des ungleichen Alterns von Körper und Gehirn	11
Abb. 2.4:	Physiologie und Pathologie der Mikroglia	15
Abb. 2.5:	Darstellung der mikroglialen Dysfunktionshypothese	16
Abb. 3.1:	Darstellung der untersuchten Gehirnregionen	21
Abb. 4.1:	Altersverteilung in den drei Kategorien	34
Abb. 4.2:	Vergleichende Darstellung der Gehirne und Gehirnschnitte	36
Abb. 4.3:	Mittlerer Anteil der Substantia grisea des frontalen Kortex	37
Abb. 4.4:	Altersassoziierte Pathologien des Neo- und Archikortex, dargestellt mittels H&E-Färbung	39
Abb. 4.5:	Schematische Darstellung einer altersassoziierten A β - Pathologie bei Hunden von 2 bis 19 Jahre	46
Abb. 4.6:	Darstellung von A β -Ablagerungen im frontalen Kortex	48
Abb. 4.7:	Ablagerungen von A β im ventralen Hippokampus	49
Abb. 4.8:	Darstellung des „fleecy A β “ mit der ABC-Methode	50
Abb. 4.9:	Darstellung kongophiler A β -Ablagerungen mittels Kongorotfärbung	52
Abb. 4.10:	Graphische Darstellung des mittleren Gehalts an A β_{8-17} und pE3A β im frontalen Kortex	54
Abb. 4.11:	Graphische Darstellung des mittleren Gehalts an A β_{8-17} und pE3A β im entorhinalen Kortex	55
Abb. 4.12:	Graphische Darstellung des mittleren Gehalts an A β_{8-17} und pE3A β im ventralen Hippokampus	56
Abb. 4.13:	Graphische Darstellung der Korrelationsanalysen	57
Abb. 4.14:	Hyperphosphoryliertes Tau im Fall 16, gefärbt mittels ABC-Methode unter Verwendung des Antikörpers AT8	58

Abb. 4.15: Darstellung des Tauproteins mit dem Antikörper AT8	59
Abb. 4.16: Frontale Kortices gefärbt mit dem Antikörper AT8 zur Darstellung des hyperphosphorylierten Tauproteins	60
Abb. 4.17: Morphologie der Mikroglia in den Gehirnregionen der Kontrollgruppe	61
Abb. 4.18: Morphologie Iba1-positiver Mikroglia bei Hunden mit Tau-Pathologie	63
Abb. 4.19: Doppelmarkierung von Mikroglia und hyperphospho- ryliertem Tau mittels Immunfluoreszenz	64
Abb. 4.20: Morphologie Iba1-immunopositiver Mikroglia bei den Satou-Stadien 1 und 2	66
Abb. 4.21: Morphologie Iba1-immunopositiver Mikroglia beim Satou-Stadium 3	68
Abb. 4.22: Morphologie Iba1-immunopositiver Mikroglia beim Satou-Stadium 4	69
Abb. 4.23: Parameter der Mikroglia des Gyrus postcruciatu	71
Abb. 4.24: Parameter der Mikroglia des Cornu ammonis	72
Abb. 4.25: Anzahl an Mikroglia im Gyrus postcruciatu in Abhängigkeit vom Satou-Stadium	73
Abb. 4.26: Anzahl an Mikroglia in der Hippokampusformation in Abhängigkeit vom Satou-Stadium	74
Abb. 4.27: Anzahl an Mikroglia im Gyrus postcruciatu in Abhängigkeit von der Kategorie	75
Abb. 4.28: HLA-DR-positive Mikroglia bei den Kontrolltieren	76
Abb. 4.29: HLA-DR-positive Mikroglia bei alten Versuchshunden	78
Abb. 4.30: HLA-DR-positive Mikroglia der Hippokampusformation	79
Abb. 9.1: Pathologie des Braak-Stadiums VI	121

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern	25
Tab. 3.2: Einstellungen der Parametern des Filament Tracer im Programm Imaris	31
Tab. 3.3: Übersicht zu Parametern der Stereologie	32
Tab. 4.1: Morphologie der caninen senilen Plaques	50
Tab. 4.2: Vergleich der Neuropathologie mit der Morphologie der Mikroglia	80
Tab. 5.1: Vergleichende Analyse der Pathomechanismen	96
Tab. 9.1: Fallübersicht mit Anamnese	118
Tab. 9.2: Einteilung der A β -Pathologie gemäß den Satou-Stadien	119
Tab. 9.3: Reagenzien und Materialien	121
Tab. 9.4: Antikörper und Seren	123
Tab. 9.5: Laborgeräte und Software	125

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Johannes Seeger, danke ich für die Überlassung des hochinteressanten Dissertationsthemas, für die stets gewährte Unterstützung, Förderung und Beratung und für sein Bestreben, mich für die Forschungsarbeit zu begeistern.

Weiterhin möchte ich mich bei dem Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie für die Ermöglichung der Durchführung dieses Projektes bedanken. Meiner Betreuerin am Fraunhofer IZI, Frau Dr. Alexandra Stolzing, danke ich für ihre intensive wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der Bearbeitung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Härtig vom Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung für sein hervorragendes Engagement und die Zeit, die er sich genommen hat, um mich in die faszinierende Welt der Immunhistologie einzuführen.

Der gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe Stammzellbiologie und allen übrigen Mitarbeitern des Hauses danke ich für eine sehr schöne Zeit im IZI. Ganz besonders möchte ich mich bei Yahaira Naaldijk und Annett Friedrich-Stöckigt für ihre hilfreichen Anleitungen und die wunderbare Atmosphäre im Büro und Labor bedanken. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Carsten Jäger für seine Ideen und seine Unterstützung sowie für seine exzellenten fotografischen Arbeiten.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Universitätsklinik für Haustiere, Nicole Willems, Dr. Marianna A. Tryfonidou und Dr. Björn P. Meij sowie Dr. Jaime E. Rofina aus dem Institut für Pathobiologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Utrecht (Niederlande) für die Entnahme und Bereitstellung des autoptischen Gehirnmaterials von jungen Laborhunden.

Danken möchte ich Prof. Dr. Thomas Arendt vom Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung für die Bereitstellung des menschlichen autoptischen Materials.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Franziska Richter für ihre Hilfe bei der Bewertung statistischer Problemstellungen.

Meinen Eltern danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen und ihre stete Unterstützung. Stefan Döbelt danke ich besonders für seine unermüdliche Geduld, seine Verlässlichkeit und seine fortwährende Unterstützung.