

Neurovaskuläre Veränderungen  
nach fokaler zerebraler Ischämie in Mäusen  
mit Alzheimer-artigen Merkmalen

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

**eingereicht von** Sarah Hofmann  
geboren am 27. Oktober 1990 in Leipzig

**angefertigt am  
in der** Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig  
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Leipzig

**1. Betreuer** Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Härtig  
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig

**2. Betreuer** PD Dr. med. Dominik Michalski  
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 29.05.2018

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Charakterisierung des Schlaganfalls . . . . .                      | 1         |
| 1.2      | Die neurovaskuläre Einheit . . . . .                               | 3         |
| 1.3      | Pathophysiologische Grundlagen der zerebralen Ischämie . . . . .   | 5         |
| 1.3.1    | Exzitotoxische Prozesse . . . . .                                  | 6         |
| 1.3.2    | Peri-Infarkt-Depolarisation . . . . .                              | 8         |
| 1.3.3    | Oxidativer Stress und Stickoxid . . . . .                          | 8         |
| 1.3.4    | Apoptose . . . . .   | 10        |
| 1.4      | Alzheimersche Demenz als Komorbidität . . . . .                    | 11        |
| 1.5      | Cholinerges und katecholaminerges System im Vorderhirn . . . . .   | 13        |
| 1.5.1    | Cholinerges System . . . . .                                       | 13        |
| 1.5.2    | Katecholaminerges System . . . . .                                 | 16        |
| 1.6      | Tiermodelle . . . . .  | 19        |
| <b>2</b> | <b>Zielstellung</b>  | <b>22</b> |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden</b>                                       | <b>23</b> |
| 3.1      | Material . . . . .   | 23        |
| 3.1.1    | Versuchstiere . . . . .  | 23        |
| 3.1.2    | Chemikalien . . . . .  | 24        |
| 3.1.3    | Lösungen . . . . .   | 24        |
| 3.2      | Methoden . . . . .   | 25        |
| 3.2.1    | Gewebeaufbereitung . . . . .                                       | 25        |
| 3.2.2    | Auswahl der Hirnschnitte . . . . .                                 | 26        |
| 3.2.3    | Indirekte Immunfluoreszenz . . . . .                               | 26        |
| 3.2.4    | Weitere Fluoreszenzmarkierungen für qualitative Analysen . . . . . | 27        |
| 3.2.5    | Kontrollfärbungen . . . . .  | 28        |
| 3.2.6    | Mikroskopie und Bildgebung . . . . .                               | 28        |
| 3.2.7    | Semiquantitative Auswertung . . . . .                              | 31        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.8     | Statistische Analysen . . . . .  | 32        |
| <b>4</b>  | <b>Ergebnisse</b>  | <b>33</b> |
| 4.1       | Altersabhängige Alzheimer-artige Veränderungen . . . . .   | 33        |
| 4.2       | Astro- und Mikrogliareaktion . . . . .   | 34        |
| 4.3       | TH und ChAT - Veränderungen nach Ischämie . . . . .  | 37        |
| 4.4       | Neurovaskuläre Veränderungen nach Ischämie . . . . .   | 39        |
| 4.5       | Ischämie-induzierte neurovaskuläre Veränderungen abhängig von Alter<br>und genetischem Hintergrund . . . . . | 45        |
| <b>5</b>  | <b>Diskussion</b>  | <b>49</b> |
| 5.1       | Versuchstiere . . . . .  | 50        |
| 5.1.1     | Die 3xTg-Maus als Modell für Alzheimer-artige Veränderungen  | 52        |
| 5.2       | Das Fadenmodell als patientennahes Schlaganfallmodell . . . . .  | 53        |
| 5.3       | Methoden . . . . .   | 54        |
| 5.3.1     | Histochemie: Vorzüge und Limitationen . . . . .  | 54        |
| 5.3.2     | Mögliche Analysefehler bei der Semiquantifizierung . . . . .   | 54        |
| 5.3.3     | Analyse des cholinergen Systems: Neuropathologische Verände-<br>rungen . . . . .                             | 55        |
| 5.3.4     | Darstellung und Analyse des katecholaminergen Systems . . . . .  | 56        |
| 5.3.5     | Methodische Limitationen . . . . .   | 58        |
| 5.4       | Modellierung krankheitsbedingter Veränderungen . . . . .   | 58        |
| 5.4.1     | Vaskuläre und gliale Veränderungen im Alzheimer-artigen Gehirn   | 58        |
| 5.4.2     | Neurovaskuläre Veränderungen durch Ischämie . . . . .  | 61        |
| 5.5       | Diagnose und Therapie der Alzheimerschen Erkrankung . . . . .  | 64        |
| <b>6</b>  | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>68</b> |
| <b>7</b>  | <b>Ehrenwörtliche Versicherung</b>   | <b>89</b> |
| <b>8</b>  | <b>Publikationen</b>   | <b>90</b> |
| <b>9</b>  | <b>Lebenslauf</b>  | <b>91</b> |
| <b>10</b> | <b>Danksagung</b>  | <b>93</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|         |   |
|---------|---|
| 3xTg    | Triple Transgen   |
| AADC    | Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase                                    |
| Abb.    | Abbildung   |
| ACh     | Azetylcholin  |
| AChE    | Azetylcholinesterase  |
| AD      | Alzheimer's disease, Alzheimersche Erkrankung                             |
| AMPA    | $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazopropionsäure                   |
| AQP4    | Aquaporin 4   |
| APP     | Amyloid-Precursor-Protein, Amyloid-Vorläuferprotein                       |
| ATP     | Adenosintriphosphat   |
| ATPase  | Adenosintriphosphat spaltendes Enzym                                      |
| BHS     | Blut-Hirn-Schranke  |
| BM      | Basalmembran  |
| ChAT    | Cholinazetyltransferase   |
| CD      | Cluster of Differentiation  |
| cLSM    | konfokales Laserscanningmikroskop   |
| Coll IV | Kollagen IV   |
| Cy2     | Carbocyanin 2   |
| Cy3     | Indocarbocyanin 3   |
| Cy5     | Indodicarbocyanin 5   |
| DBH     | Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase   |
| DNA     | Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure                             |
| DTI     | Diffusion Tensor Imaging, Diffusions-Tensor-Bildgebung                    |
| EAAT    | Excitatory amino-acid transporter, Exzitatorischer Aminosäure-Transporter |
| EZM     | Extrazelluläre Matrix   |
| GABA    | Gamma-Aminobutyric Acid, Gamma-Aminobuttersäure                           |
| GFAP    | Glial Fibrillary Acidic Protein, Saures Gliafaserprotein                  |
| GLAST   | L-Glutamat-L-Aspartat-Transporter   |
| GLT-1   | Glutamat-Transporter-1  |
| Iba     | Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule-1, Iba-1                         |
| IgG     | Immunglobulin der Klasse G  |
| IL      | Interleukin   |

|              |  |
|--------------|--|
| KG           | Körpergewicht  |
| K.o.         | Knock-out  |
| MMP          | Matrix-Metalloproteinase   |
| MRT          | Magnetresonanztomographie  |
| NeuN         | Neuronal Nuclei, Nervenzellkerne   |
| NFT          | Neurofibrilläre Tangles  |
| NGS          | Normal Goat Serum, Ziege-Normalserum   |
| NMDA         | N-Methyl-D-Aspartat  |
| NOS          | Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase   |
| NVU          | Neurovascular Unit, Neurovaskuläre Einheit   |
| PBS          | Phosphate-buffered Saline, Phosphat-gepufferte Kochsalz-<br>lösung                               |
| PFA          | Paraformaldehyd  |
| PFI          | Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung   |
| PNMT         | Phenylethanolamin-N-Methyltransferase  |
| PS1          | Präsenilin1  |
| ROI          | Region Of Interest   |
| ROS          | Reactive Oxygen Species, Reaktive Sauerstoffspezies  |
| RSA          | Rinderserumalbumin   |
| s.c.         | subkutan   |
| STL          | <i>Solanum tuberosum</i> Lektin, Kartoffellektin   |
| Tab.         | Tabelle  |
| TBS          | Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris-buffered saline)  |
| TBS-RSA      | Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 2% Rinderserumalbumin<br>enthaltend                              |
| TH           | Tyrosinhydroxylase   |
| TJ           | Tight Junction (Schlussleistenkomplex)   |
| tMCAO        | transient Middle Cerebral Arteria Occlusion, transienter<br>Verschluss der Arteria cerebri media |
| TNF $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$  |
| TRIS         | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| WT           | Wildtyp  |
| ZNS          | Zentrales Nervensystem   |

SI- und SI-konforme sowie im Duden verzeichnete Einheiten sind nicht aufgeführt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Charakterisierung des Schlaganfalls

Die Weltgesundheitsorganisation WHO definiert einen Schlaganfall als ein sich rasch entwickelndes Zeichen einer fokalen oder globalen Störung der zerebralen Funktion ohne erkennbare Ursachen außer einer vaskulären, wobei sich Symptome (siehe Tabelle 1.1) anschließen, die 24 Stunden oder länger andauern oder gar zum Tode führen (Bonita 1992).

**Tabelle 1.1:** Symptome bei einem akuten ischämischen/hämorrhagischen Schlaganfall geordnet nach Lokalisation. Nach Sobesky und Stengl 2011.

| Gefäßverschluss           | Anteil | Symptomatik   |
|---------------------------|--------|---|
| Arteria cerebri media     | 80%    | Gefühlsstörungen und Lähmungen auf der kontralateralen Körperhälfte, an Fingern und im Gesicht am stärksten ausgeprägt, teilweise Sehverlust in gegenüberliegender Gesichtshälfte                           |
| Arteria cerebri posterior | 10%    | Sehverlust des kontralateralen Gesichtsfelds, Bewusstseins- und Gefühlsstörungen auf kontralateraler Körperseite  |
| Arteria cerebri anterior  | 5%     | Halbseitige Lähmung auf kontralateraler Seite, Bein stärker beeinträchtigt als Arm  |
| Hirnstammgefäße           | 20-50% | Sehstörungen, Störungen des Bewegungsapparates, Gefühlsstörungen, Hinterkopfschmerzen, Zuckungen der Augäpfel, Unsicherheiten beim Gehen, Sprechstörungen und in schweren Fällen auch Bewusstseinsstörungen |

Der Schlaganfall war laut statistischem Bundesamt 2012 mit 20.387 Todesfällen (männlich: 7492, weiblich: 12.895) unter den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland; das entspricht einem Anteil von 2,3% aller Todesfälle. Nach dem Schlaganfallereignis verstarben 12% der Patienten innerhalb der ersten 28 Tage und 22% innerhalb von 3 Monaten (Ward et al. 2005).

Die jährliche Inzidenz des Schlaganfalls im Jahr 2005 betrug 123 / 100.000 Einwohner (van den Bussche et al. 2010). Heuschmann et al. (2010) berichten von 196.000 Neuer-

krankungen sowie 66.000 Rezidivereignissen jährlich. Fortschritte bei Prävention und Therapie des Schlaganfalls haben in den letzten Jahrzehnten zu stetig fallenden Inzidenzzahlen und Mortalitätsraten in den hoch entwickelten Ländern geführt (Feigin et al. 2009; Kunst et al. 2011).

Ungeachtet der rückläufigen Inzidenz in den letzten Jahren (Lee et al. 2011) ist der Schlaganfall als schwerwiegende, plötzlich auftretende zerebrovaskuläre Erkrankung die zweithäufigste Todesursache und häufigster Grund für langanhaltende Invalidität weltweit (Lonzano et al. 2012).

Die auch aus medizinökonomischer Sicht folgenschwere Erkrankung gilt als die häufigste Ursache für lebenslange Behinderung im Erwachsenenalter und zählt somit volkswirtschaftlich zu den teuersten Erkrankungen (Ward et al. 2005). Zudem zieht der Trend der „demographischen Alterung“ einen absoluten Anstieg der Gesamtzahl der Schlaganfälle in den kommenden Jahren nach sich (Kolominsky-Rabas und Heuschmann 2002; Truelsen et al. 2006; Foersch et al. 2008). Daraus resultiert das steigende Interesse, detaillierte pathophysiologische Veränderungen zu verstehen, worauf sich die Intensivierung der Schlaganfallforschung begründet.

Aus der Unterbrechung des zerebralen Blutflusses resultiert der Schlaganfall als eine heterogene Gruppe verschiedener Zustände, die sich als neurologische Defizite manifestieren (Giraldo 2011). Ein Schlaganfall kann ischämisch oder hämorrhagisch bedingt sein. Mit einer Prävalenz von 80% sind akute thrombotische oder embolische Verschlüsse eines hirnversorgenden Gefäßes viermal häufiger als hämorrhagische Infarkte durch intrazerebrale oder subarachnoidale Blutungen (Morgenthaler et al. 2004). In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit werden ausschließlich ischämische Anfälle untersucht. Das am häufigsten betroffene Areal ist dabei das Stromgebiet der Arteria cerebri media (Carter 1963; Mhairi Macrae 1992). Abbildung 1.1 zeigt einen Überblick der zerebrovaskulären Territorien, jeweils mit anatomischer Bezeichnung und versorgendem Gefäß. Je nach Infarktareal treten sehr variable neurologische Symptome auf. Die Ergebnisse neurologischer Untersuchungen erlauben, frühzeitig Rückschlüsse auf den Ort des Gefäßverschlusses zu ziehen. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick der nach Infarktgebiet geordneten Symptome beziehungsweise Ausfallserscheinungen.

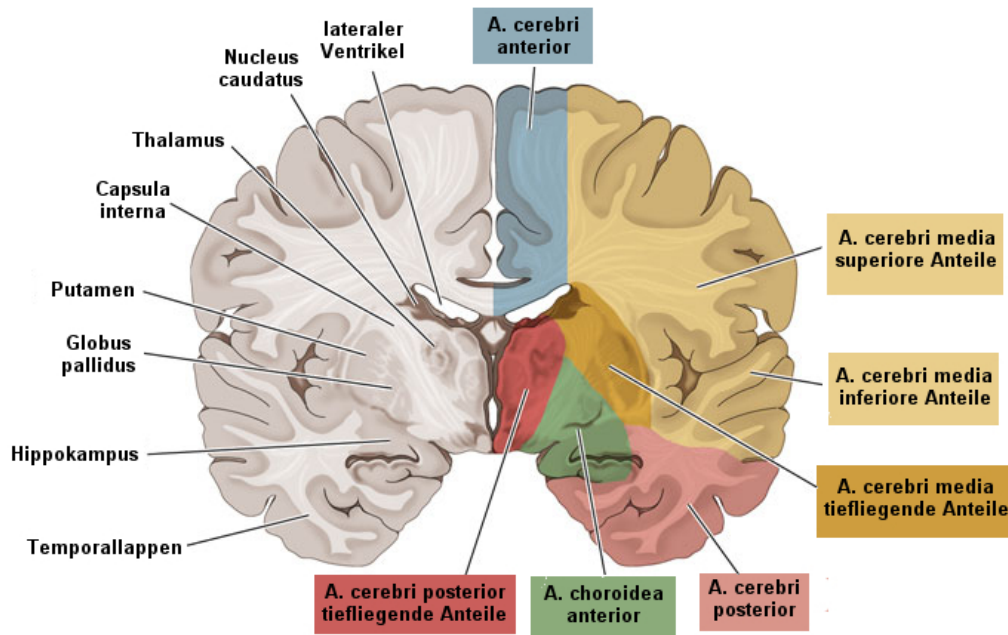


Abbildung 1.1: Übersicht Hirnarterien. Nach Blumenfeld, 2002.

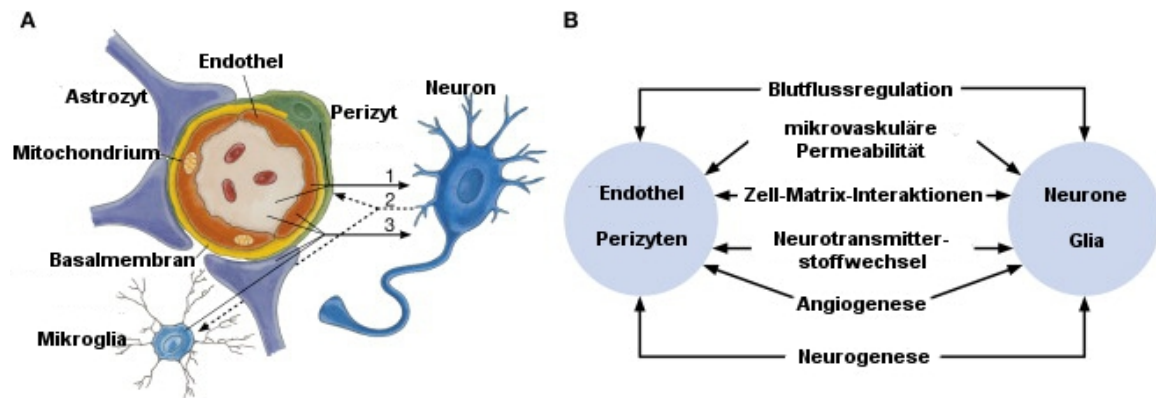
## 1.2 Die neurovaskuläre Einheit

Die Ausfallserscheinungen nach Schlaganfall sind komplex und keinesfalls nur auf Nervenzellen beschränkt. In den letzten Jahren hat man sich neueren Denkansätzen zugewandt, bei denen neben Nervenzellen auch Astro- und Mikroglia in Assoziation mit Gefäßen berücksichtigt werden, zusammengefasst als neurovaskuläre Einheit (neurovascular unit, NVU). Die nach Ischämie zu untersuchende NVU setzt sich aus zellulären Hauptbestandteilen des Gehirns zusammen (del Zoppo et al. 2009; Kwon et al. 2009). Dazu zählen Neuronen, Astrozyten, Endothel, Perizyten, Mikroglia und perivaskuläre Makrophagen (Bell et al. 2009) sowie die extrazelluläre Matrix (EZM; del Zoppo 2009).

Das hirneigene Gefäßsystem entspringt aus den großen Arterien der Hirnbasis, aus dem Circulus arteriosus Willisii. Diese Arterien verzweigen sich durch die Dura mater in leptomeningeale oder piale Arterien, die oberflächlich in den Subarachnoidalraum gelangen. Oberflächliche piale Arterien verzweigen sich wiederum in intrazerebrale Arterien und Arteriolen (20-90µm). Zerebrale Arterien sind dreischichtig und bestehen aus Tunica intima (Endothel), Tunica media (hauptsächlich glatte vaskuläre Muskulatur) und Tunica adventitia (Kollagenfasern, Fibroblasten, Nervenzellen). Die Endo-



thelzellen bilden, die Blutgefäße umschließend, eine hochspezialisierte Membran, die das Grundgerüst für die Blut-Hirn-Schranke (BHS, blood-brain-barrier, BBB) darstellt. Die Aufgabe der glatten vaskulären Muskulatur besteht in der Kontrolle der BHS, für deren Aufrechterhaltung die NVU essentiell ist. Da sowohl die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke als auch der zerebrale Blutfluss durch die NVU kontrolliert werden, spielt sie eine entscheidende Rolle für die Stabilität des neuronalen Gleichgewichts. Die Funktionen der NVU sind schematisch in Abbildung 1.2 dargestellt.



**Abbildung 1.2:** Neurovaskuläre Einheit und ihre Funktionen. Nach Zlokovic, 2008.

1: Bei neurovaskulärer Destruktion können neurotoxische Substanzen die BHS durchqueren und/oder proinflammatorische Signale sowie ein reduzierter Blutfluss neuronalen Schaden triggern.

2: Im Falle primärer neuronaler Schädigung senden Neurone Signale an Mikroglia- und Endothelzellen.

3: Aktivierung der vaskuloglialen Einheit führt zur Progression des Schadens.

Ein gesundes Gehirn ist angewiesen auf das exakte Zusammenspiel aller Zellen der NVU, die miteinander sowie mit neuronalen Synapsen und Kreisläufen in Kommunikation stehen (Iadecola 2004; Zlokovic 2008). Die Zell-Zell-Kommunikation ist ein unverzichtbarer Faktor, um eine normale kognitive Funktion und Homöostase zu bewahren. Daraus ergibt sich, dass eine Dysfunktion der NVU die Ursache vieler Krankheiten darstellt. Die Funktionalität der NVU sowie die Integrität der BHS sind beispielsweise bei Erkrankungen wie der Alzheimerschen Demenz (AD), Multipler Sklerose oder dem ischämischen Schlaganfall beeinträchtigt (Stanimirovic et al. 2012; del Zoppo 2012; Dirnagl 2012). Das Konzept der NVU zeigt, dass die Erhaltung der vernetzten zellulären Funktionen wichtiger ist als der alleinige Schutz einzelner Zellen (Zhang et al. 2012).

Im Fokus der Forschung stehen vor allem pathophysiologische Mechanismen, die für die Störung der NVU verantwortlich sind. Diese Untersuchungen haben erhebliche klinische Relevanz, da man sich ein genaueres Verständnis der Pathomechanismen zerebrovaskulärer Erkrankungen sowie neuartige Therapieansätze erhofft.

Pathologische Zustände, wie z.B. Hypoxie, bedingen eine Veränderung der NVU, wodurch das Ausmaß der ZNS-Schädigung wesentlich bestimmt wird. Dabei haben Neuronen und Astrozyten in der Regel die geringste ischämische Toleranz, wogegen Endothelzellen zwar mehrere Stunden ohne Sauerstoff und Glukose überleben können, jedoch ohne eine entsprechende Astrozytenfunktion ihre BHS-Eigenschaften verlieren (Klöppel et al. 2012).

Experimentelle Studien an Nagetieren haben gezeigt, dass bei einem Schlaganfall alle Komponenten der NVU beeinträchtigt werden. Hauptsächlich resultiert die Schädigung offenbar aus der Wirkung von Matrix-Metalloproteasen (Zhao et al. 2007)

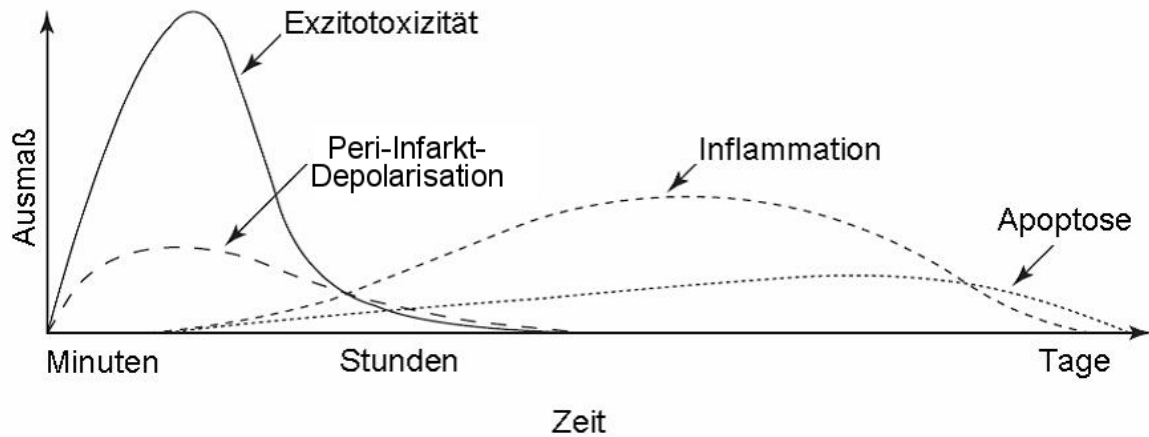
## 1.3 Pathophysiologische Grundlagen der zerebralen Ischämie

Das Gewebe des Gehirns besitzt einen hohen Bedarf an Sauerstoff und Energie. Bereits auf geringe ischämische Störungen reagiert es empfindlich (Lee et al, 2000). Trotz seines mit 2% geringen Anteils am Körpergewicht verbraucht das Gehirn mit 14% einen relativ hohen Anteil des Herzzeitvolumens (Goldmann, 2012). Dabei beträgt der zerebrale Sauerstoffverbrauch etwa 20% des gesamten Sauerstoffverbrauchs des Körpers.

Nur kurzfristig kann das Gehirn die beim ischämischen Schlaganfall akut unterbrochene Blutzufuhr kompensieren und den eigenen Struktur- und Energiestoffwechsel aufrechterhalten.

Anhaltende Hypoxie führt durch den Energieverlust zum Einsetzen der ischämischen Kaskade und zum Zelluntergang. Die ischämische Kaskade ist ein komplexer Vorgang, in den mehrere, nachfolgend näher beschriebene Prozesse involviert sind. Zu den ersten ischämischen Veränderungen zählen ein zellulärer Energieverlust, die Störung der Zellionenhomöostase (Jayakumar und Norenberg 2010), das Auftreten von Peri-Infarkt-Depolarisationen (Nakamura et al. 2010), erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel sowie eine hauptsächlich durch Glutamat hervorgerufene Exzitotoxizität und das Ausbilden von Nekrosen (Woodruff et al. 2010). Spätere pathophysiologische Veränderungen sind durch freie Radikale verursachte Toxizität, die Schädigung der BHS,

Entzündungen (Dirnagl et al. 1999; Doyle et al. 2008) und letztendlich der programmierte Zelltod (Broughton et al. 2009; Dirnagl et al. 1999; Doyle et al. 2008; Mattson et al. 2000). Einen Überblick über die zeitlichen Abläufe gibt Abbildung 1.3. Die einzelnen Mechanismen werden in den folgenden Abschnitten detaillierter erläutert.

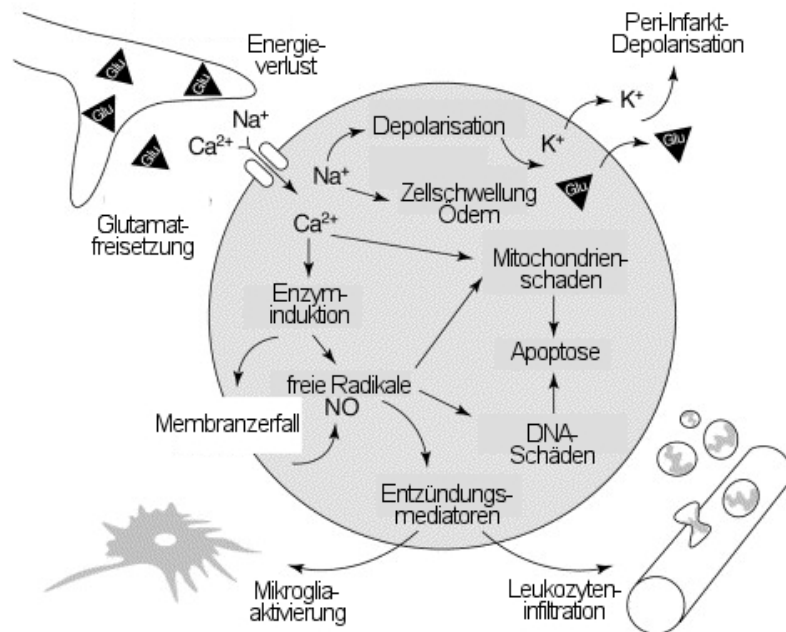


**Abbildung 1.3:** Zeitlicher Verlauf pathologischer Veränderungen nach zerebraler Ischämie. Nach Dirnagl et al. 1999.

### 1.3.1 Exzitotoxische Prozesse

Durch den beim Schlaganfall verminderten zerebralen Blutfluss resultiert nicht nur eine rasche Entleerung der intrazellulären Energiespeicher, sondern auch die Hemmung der mitochondrialen Adenosintriphosphat(ATP)-Synthese. Ursächlich für das ATP-Defizit ist ein Sauerstoffmangel, der zum Zusammenbruch der Atmungskette führt. Das vorhandene ATP wird in kürzester Zeit verbraucht. Bereits eine Ischämie für 20 Sekunden (Kempski 1994) bzw. 15 Sekunden (Hamann 1997) führt zum vollständigen Verbrauch der ATP-Vorräte. Alternative Energiereserven können von Neuronen nicht genutzt werden (Geocadin et al. 2008); somit ist nach einem akuten Schlaganfallereignis mit einer sofortigen Veränderung des hirneigenen Metabolismus zu rechnen. Davon sind zelluläre Ionenpumpen an erster Stelle betroffen. Durch die ATP-Mangelversorgung können  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen ihre Funktion nicht mehr erfüllen und es kommt zur Freisetzung von Kalium-Ionen in den Extrazellularraum (Caplan 2002) sowie zum Rücktransport von Natrium-Ionen in die Zellen. Dem Gradienten folgend strömt mit den Natrium-Ionen auch Wasser in die Zellen und es resultiert ein zytotoxisches Zellödem, das außer den Neuronen auch alle anderen Zellen der NVU erfasst (Kahle et al. 2009). Zudem ist der Kalziumhaushalt vom Energieverlust betroffen:

Die Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der Plasmamembran ist drastisch eingeschränkt, woraus ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration resultiert. Dem folgt eine Aktivierung kalziumabhängiger Proteasen, Lipasen und DNAasen, die katabole Nekrosen verursachen (Edvisson und Krause 2002; Lipton 1999). In Abbildung 1.4 sind die pathophysiologischen Mechanismen nach fokaler Ischämie dargestellt.



**Abbildung 1.4:** Pathophysiologische Mechanismen nach fokaler Ischämie. Nach Dirnagl et al. 1999.

Eine weitere ausschlaggebende Konsequenz, die dem ATP-Mangel und intrazellulärem Natriumüberschuss folgt, ist die Störung des Membranpotentials mit unkontrollierter Depolarisation der neuronalen Plasmamembranen. Glutamat als häufiger exzitatorischer Neurotransmitter wird dabei neben anderen Transmittern übermäßig freigesetzt (Doyle et al. 2008; Woodruff et al. 2010) und wegen des herrschenden Energiemangels verzögert aus dem synaptischen Spalt wiederaufgenommen. Aus der Membrandepolarisierung und intrazellulären Akkumulation von Natrium-Ionen resultiert zudem eine veränderte Wirkungsweise der natriumabhängigen Glutamattransporter, wodurch Glutamat auch gegen den Konzentrationsgradienten die Zelle verlassen kann (Doyle et al. 2008; Gonzalez und Robinson 2004). Zu diesen Transportern zählen zum Beispiel der L-Glutamat-L-Aspartat-Transporter (GLAST), der Glutamat-Transporter-1 (GLT-1), der Exzitatorische Aminosäure-Transporter-1 (Excitatory amino-acid transporter 1, EAAT1), EAAT4 sowie EAAT5 (Doyle et al.

2008; Gonzalez und Robinson 2004).

Das Überangebot von Glutamat bewirkt eine Aktivierung der Glutamatrezeptoren, insbesondere von ionotropen NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat-) und metabotropen AMPA-( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazopropionsäure)-Rezeptoren. NMDA-Rezeptoren sind kalziumpermeabel; ihre Aktivierung führt zum Kalzium-Influx, weshalb sich das intrazelluläre Kalziumaufkommen noch vergrößert (Olney und Sharpe 1969). Es kommt zu einer Reizüberflutung, wodurch ein Selbstzerstörungsmechanismus der Nervenzellen ausgelöst wird, der Prozesse wie Nekrose, Apoptose oder auch Autophagozytose umfasst. Bei diesem Phänomen spricht man von Exzitotoxizität.

### **1.3.2 Peri-Infarkt-Depolarisation**

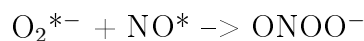
Die bereits beschriebene Depolarisationswelle greift vom Kern der Ischämie auch auf das periphere Nicht-Infarkt-Gebiet über (Nedergaard und Astrup 1986; Back et al. 2004). Dieser Randbereich, der unmittelbar an die Nekrosezone heranreicht, aber noch überlebensfähige Zellen enthält, wird Penumbra genannt (Astrup et al. 1981). Die strukturelle Intaktheit der Zellen ermöglicht eine, wenn auch zeitlich begrenzte, vollständige Reversibilität pathologischer Veränderungen (Symon et al. 1977; Hakim 1987; Ginsberg 1997; Ginsberg 2002; Back et al. 2004). Um diese Wiederherstellung zu erreichen, ist eine durch hohen Energieverbrauch erfolgende Repolarisation erforderlich. Allerdings drohen aus der Ischämie-bedingten Membranstabilität noch innerhalb der nächsten 6 bis 8 Stunden weitere Depolarisationen mit Konzentrationserhöhungen von Kalium und Glutamat; die Zellen sterben ab und der Infarkt wächst (Astrup et al. 1981; Olsen et al. 1983; Mies et al. 1993). Die sogenannte Peri-Infarkt-Depolarisation ist verantwortlich für ein Fortschreiten der ischämischen Schädigungen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Depolarisationen und der Infarktgröße (Mies et al. 1993).

### **1.3.3 Oxidativer Stress und Stickoxid**

Parallel zu den beschriebenen Veränderungen der Ionenkonzentration führt die Minderperfusion im Infarktkern durch die resultierende Störung der mitochondrialen Funktion zur Bildung freier Sauerstoffradikale (Halliwell 1994; Sugawara und Chan 2003). Vor allem durch die Neuronen, die einen geringen Spiegel an Antioxidantien aufweisen, ist das Hirn wenig tolerabel gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

(Coyle und Puttfarcken 1993). Hohe ROS-Konzentrationen können nicht ausreichend kompensiert werden, und es kommt zur irreversiblen Zellschädigung in Form von Membrandestruktion, Nukleinsäureabbau und Störung des Energiestoffwechsels, woraus letztlich der programmierte Zelltod, die Apoptose, resultiert (Halliwell 1994; Sugawara und Chan 2003).

Zugleich kommt es auch zur Aktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), welche die Bildung von radikalem Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^*$ ) katalysiert (Iadecola et al. 1995; Zhang et al. 1994). Durch Reaktion mit Superoxidanionen ( $\text{O}_2^{*-}$ ) ergibt das stabile Stickstoffmonoxid nach folgender Gleichung (Beckmann 1994)



das sehr potente Zellgift Peroxynitrit. Unter proinflammatorischen Bedingungen, wenn NO und Superoxide simultan in größeren Mengen entstehen bzw. nicht ausreichend abgebaut werden können, kann die Bildung von  $\text{ONOO}^-$  um das Einmillionenfache ansteigen (Szabó et al. 2007).

Die Radikalbildung verursacht eine Hochregulierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die unter physiologischen Bedingungen nur in geringer Konzentration innerhalb der EZM vorhanden sind (Doyle et al. 2008; Siesjö 1992). MMP können die EZM im aktivierten Zustand abbauen. Bestimmte Domänen befähigen die Enzyme, sich in der EZM oder Basalmembran zu verankern (del Zoppo et al. 2007). Besonders deutlich ausgeprägt ist dieser Verankerungsmechanismus bei MMP-2 und MMP-9 (Fukuda et al. 2004; Bauer et al. 2012; del Zoppo et al. 2007), aus deren Aktivierung eine Zerstörung der Basalmembran und der EZM sowie eine zunehmende Permeabilität der BHS bis hin zum kompletten Schrankenverlust resultieren (van Lint et al. 2007). Darüber hinaus erfüllen MMP Funktionen bei der Prozessierung von Signalmolekülen und werden mit Zellproliferation, Migration, Differenzierung, Angiogenese sowie Apoptose in Verbindung gebracht.

Freie Sauerstoffradikale sowie Kalziumeinstrom und Hypoxie führen zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Gene mit nachfolgender Bildung von Entzündungsmediatoren. Als Konsequenz aus dem oxidativen und nitrosativen Stress folgen die Rekrutierung und die Migration von Neutrophilen sowie anderen Leukozyten in die Blutgefäße des Gehirns (Crack und Taylor 2005). Daraus lässt sich die infarktbegleitende Entzündungsreaktion der Ischämiezone erklären.

### 1.3.4 Apoptose

Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD (Rohn et al. 2001) und Morbus Parkinson (Hartmann et al. 2000) sowie bei akuten Ereignissen wie Traumata (Springer et al. 1999), zerebralen Krampfanfällen (Gillardon et al. 1997) oder nach zerebraler Ischämie bzw. Reperfusion (Böttiger et al. 1999) ist neuronale Apoptose von ausschlaggebender Bedeutung.

Bereits beschriebene Ereignisse - wie Glutamatrezeptoraktivierung, Kalziumüberladung und Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies - können Zellen in Nekrose oder Apoptose treiben (Dirnagl et al. 1999). Ob es zu apoptotischen oder nekrotischen Prozessen kommt, ist abhängig von Art und Intensität der Stimuli (Kato und Kogure 1999), den betroffenen Zelltypen und den zellulären Entwicklungsstadien (Leist und Nicotera 1998).

Infarktwachstum in der Penumbra wird verursacht durch Apoptose, da hier mildere ischämische Prozesse ablaufen und noch ATP vorhanden ist (Ferrer und Planas 2003; Kato und Kogure 1999; Kerr 1965; Kerr et al. 1972). Dieses Infarktwachstum nach Ischämie ist ein generelles Phänomen (Hossmann 2006); nach Baird et al. nimmt die Infarktgröße in den ersten 7 Tagen um 20% zu (Baird et al. 1997; Back et al. 2004). In besonders vulnerablen Gehirnregionen (Hippokampus, Nucleus reticularis thalami), aber auch bestimmten Schichten des Neokortex ist die Apoptose mit einer verspätet einsetzenden Neurodegeneration assoziiert (Padosch et al. 2001).

Das Phänomen der selektiven Vulnerabilität bezeichnet die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Zellpopulationen gegenüber Sauerstoffmangel (Paulus et al. 2012). Bereits nach sehr kurzer Ischämiezeit (< 1 Min.) kommt es zu irreversiblen Schäden, wobei makroskopisch keine Nekrose erkennbar ist (Ringelstein und Nabavi 2007). Im Tierversuch konnte für Ratten gezeigt werden, dass zunächst Zellen der CA1-Schicht des Hippokampus geschädigt werden, später CA3-Pyramidenzellen, Körnerzellen des Gyrus dentatus und Gliazellen. Sehr resistent erscheinen Endothelzellen (Hasner et al. 2000). Jedoch haben neuere Arbeiten gezeigt, dass eine Ischämiebedingte Schädigung der BHS aus einer Zerstörung der Endothelzellen resultiert (Krueger et al. 2013; 2015).

In der vorliegenden Arbeit werden unter dem Gesichtspunkt der selektiven Vulnerabilität das cholinerge und katecholaminerge System vor allem im Striatum betrachtet. Das Striatum präsentiert eine Reihe verschiedener neuronaler Zelltypen (Tepper et al. 2010), stellt jedoch auch ein Areal dominanter cholinergischer Transmission dar (Benarroch 2012). Dadurch gewinnt das Striatum große Bedeutung im Hinblick auf schlag-

anfallrelevante Veränderungen z.B. des cholinergen Systems.

## 1.4 Alzheimersche Demenz als Komorbidität

Das Risiko für die Alzheimersche Erkrankung wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst; unter anderem besteht ein größeres Risiko nach Auftreten eines Schlaganfalls (Keeley et al. 2014). Alzheimer-Patienten haben zum einen ein erhöhtes Risiko für ein ischämisches Ereignis (Tolppanen et al. 2013), zum anderen ist ein Auftreten eines Schlaganfalls bei Alzheimer-Patienten mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Doraiswamy et al. 2002; Hachinski 1979, 2011). Das Alter scheint dabei der zentrale Faktor zu sein, der die Überlappung beider Erkrankungen erklärt, da es im Alter sowohl zu einer erhöhten Rate an Schlaganfällen als auch der AD kommt (Alzheimer's Association 2016; Hankey 2017). Keeley et al. (2014) postulierten, dass  $\beta$ -Amyloid und Ischämie gemeinsam schlechtere funktionelle Konsequenzen hervorrufen, als wenn diese Faktoren allein auftreten. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass ischämische Ereignisse, insbesondere mildere Formen, in Anwesenheit von hohen  $\beta$ -Amyloid-Konzentrationen - höhere Infarkt volumina, fulminantere Entzündungsreaktionen und einen schwereren Gedächtnisverlust verursachen - im Vergleich zum alleinigen Auftreten von Ischämie oder  $\beta$ -Amyloidose (Amtul et al. 2014a; Cechetto et al. 2008; Whitehead et al. 2005a, 2005b, 2007). Die offensichtliche wechselseitige Beeinflussung erschwert die Konzipierung von erfolgreichen Behandlungsstrategien (Endres et al. 2008; Banik et al. 2015). Als Konsequenz fehlgeschlagener therapeutischer Strategien kam es zur Erweiterung der Forschung zu komplexeren Ansätzen mit Berücksichtigung von Neuronen, Astro-, Mikroglia in Assoziation mit Gefäßen, zusammengefasst als NVU (del Zoppo et al. 2009; 2010).

Der demografische Wandel, einhergehend mit der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung weltweit, ist ausschlaggebender Antrieb der Zunahme von altersbedingten Erkrankungen, insbesondere Demenzerkrankungen. Als häufigste Form tritt dabei die AD auf, die circa 55% aller Demenzfälle umfasst. Laut WHO gab es bereits 2001 weltweit eine Prävalenz der AD von 18 Millionen; man rechnet mit einer Verdoppelung der Fallzahl auf circa 34 Millionen bis 2025. In Deutschland beträgt die Prävalenz von Demenzerkrankungen etwa 1,1 Millionen, wobei zwei Drittel der Patienten an der Alzheimerschen Erkrankung leiden (Robert-Koch-Institut 2009).

Die Erstbeschreibung geht auf den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer zurück, der bereits 1906 in Tübingen die Erkrankung von Auguste Deter



als ersten Fall dieser Demenzerkrankung beschrieb (Vishal et al. 2011). Über 100 Jahre später stellt diese Erkrankung eine große und weiter zunehmende Herausforderung an das Gesundheitssystem und die Hirnforschung dar.

Symptomatisch ist die AD gekennzeichnet durch ein progredientes kognitives Defizit, Gedächtnisstörungen sowie Verlust von Sprache, praktischen Fähigkeiten und visuellem Erkennen. Im Endstadium kommt es zum Defizit von Alltagsaktivitäten, Verhaltensänderungen und Hirnatrophie, wodurch eine vollständige Abhängigkeit von Außenstehenden resultiert, bis die Krankheit im Durchschnitt 9 Jahre nach Diagnosestellung einen letalen Ausgang nimmt (Medeiros und LaFerla 2013; Querfurth und LaFerla 2010).

Trotz wachsenden Wissens über molekulare Pathomechanismen bleibt die genaue Ätiologie und der Zusammenhang pathologischer Veränderungen im Gehirn Gegenstand intensiver Forschung (Streit 2004; Jack et al. 2009; Mattsson et al. 2015).

Es gibt mehrere Theorien zu Entstehungsmechanismen der AD. Die cholinerge Hypothese (Wenk et al. 1979; Bigl et al. 1982; Francis et al. 1999) sieht als Grund für die AD eine reduzierte Azetylcholinsynthese an, durch die es zum Untergang cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn kommt (Whitehouse et al. 1982; Arendt et al. 1983; Coyle et al. 1983; Schliebs und Arendt 2011). Histologische Befunde und die Erkenntnis, dass Azetylcholin (ACh) ausschlaggebend für die Vigilanz ist, stützen diese These (Dawson et al. 1992). Auch eine medikamentöse Therapie mit Azetylcholinesterasehemmern kann kurzzeitig zu einer Verbesserung der Symptomatik führen (Giacobini 2004). Allerdings sind auch Defizite in anderen Neurotransmittersystemen von Bedeutung, womit die cholinerge Dysfunktion nicht als alleiniger Entstehungsmechanismus anzusehen ist (Nelson et al. 2012).

Weitere Theorien postulieren als Krankheitsursache Ablagerungen von fehlgefalteten  $\beta$ -Amyloid-Peptiden in extrazellulären Amyloidplaques (senilen Plaques), hypophosphorylierten Tau-Proteinen in Neurofibrillenbündeln (Braak und Braak 1991) sowie eine starke Gliaaktivierung (Nagele et al. 2004). Zudem scheinen sowohl vaskuläre Faktoren, die zu einer chronischen Minderdurchblutung des Gehirns führen (de la Torre 2004) als auch verringerte Insulinspiegel einhergehend mit einer zentralnervösen Insulinrezeptorresistenz im Gehirn (Rivera et al. 2005) von Bedeutung zu sein. Es lässt sich schlussfolgern, dass zahlreiche zentralnervöse Veränderungen im Entstehungsprozess der AD diskutiert werden, aber bislang keine konkrete Ursache identifiziert wurde. Möglich ist auch, dass es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren handelt. Als histologische Korrelate finden sich u.a. senile Plaques, neurofibrilläre

Tangles (NFT), Verlust kortikaler Neurone, Astrogliose, Degeneration der Granulovakuolen in den Pyramidenzellen des Hippokampus, Amyloidangiopathie, Neurodegeneration im Nucleus basalis Meynert und Synapsenverlust (Beach et al. 1989; Itagaki et al. 1989; Mandelkow und Mandelkow 1998; Trojanowski and Lee 2000; Iqbal und Grundke-Iqbal 2002; Crews und Masliah 2010; Montine et al. 2012).

## 1.5 Cholinerges und katecholaminerges System im Vorderhirn

### 1.5.1 Cholinerges System

Eine gleichbleibend wichtige Herausforderung der Neurowissenschaften bleibt das vertiefte Verständnis der Funktion und Modulation des cholinergen Systems. Seit in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts Azetylcholin als erster Neurotransmitter und Cholinazetyltransferase (ChAT) als Synthesenzym für Azetylcholin identifiziert wurden, besteht ein immenses Interesse an der Erforschung cholinergischer Neurone und ihrer Erfüllung von Basisfunktionen des Gehirns.

Chemische Stoffe, die eine ausschlaggebende Rolle im cholinergen System spielen, sind ACh, Azetylcholinesterase (AChE) und ChAT. Unter biochemischen Gesichtspunkten ist ACh als quartäre Ammoniumverbindung ein Ester der Essigsäure und des einwertigen Aminoalkohols Cholin.

Azetylcholin als einer der wichtigsten Neurotransmitter aller Säugetiere ist seit langem bekannt. Experimente am Froschherzen ließen Otto Loewi bereits 1921 zu der Erkenntnis kommen, dass für die Übertragung von Nervenimpulsen auf das Herz ein chemischer Stoff verantwortlich ist, den er zunächst Vagusstoff nannte. Die Identifizierung dieses Stoffes als Azetylcholin gelang Loewi und Navratil 1926. Darüber hinaus erkannte der britische Biochemiker Henry H. Dale schon 1914 die pharmakologischen Effekte von Azetylcholin sowie anderer Ester und demonstrierte die Freisetzung von ACh an der neuromuskulären Endplatte (Dale et al. 1936). Daraufhin belegte er die Theorie der neurohumoralen Übertragung (Dale 1938) und zeigte zudem, dass die cholinerge Übertragung eine ausschlaggebende Rolle im zentralen, peripheren und autonomen Nervensystem spielt.

Die Verteilung von Azetylcholin im zentralen Nervensystem wurde erst in den 1980er Jahren weitgehend geklärt (Wainer et al. 1984, Eckenstein 1985). Wesentlicher Grund für diesen recht langsamen Erkenntniszuwachs war die komplizierte morphologische

Identifikation spezifischer cholinergere Strukturen im Gehirn (Wainer et al. 1984). Ein weiterer Schritt von zentraler Bedeutung war die Entdeckung des Enzyms AChE (Galehr und Plattner 1928; Engelhart und Loewi 1930), das für den Abbau von ACh verantwortlich ist. Enzymhistochemische Verfahren zur Lokalisation von AChE basieren auf schwerlöslichen, nach AChE-Katalyse entstehenden Reaktionsprodukten (Koelle und Friedenwals 1949; Karnovsky und Roots 1964). Weitere Forschungen zeigten jedoch, dass diverse nicht-cholinergere Zellpopulationen auch eine hohe Aktivität der AChE aufweisen, darunter besonders katecholaminergere und serotonergere Zellen des Hirnstammes (Koelle 1969; Jacobowitz und Palkovits 1947; Butcher et al. 1975; Hoover et al. 1978). Somit ist AChE nicht als spezifisches Enzym für das cholinergere System anzusehen.

Ein selektiver Marker für cholinergere Neuronen ist deren Leitenzym ChAT (Nachmansohn und Machado 1943), das die Synthese von ACh aus Azetyl-Koenzym A und Cholin katalysiert. Mit Antikörpern gegen ChAT (Levey et al. 1981; Crawford et al. 1982; Eckenstein und Thoenen 1982; Levey et al. 1983), deren Gewinnung viele Jahre ein schwieriges technisches Problem war (Rossier 1981), gab es spezifische Marker cholinergere Strukturen vor allem im Hirngewebe (Kuhar 1976; Levey et al. 1983; Wainer 1984). ChAT-Markierungen durch Immunperoxidase- oder Immunfluoreszenzmethoden erlauben ein besseres Verständnis der cholinergere Innervation und der entsprechenden Hirnfunktionen.

Die tragende Rolle cholinergere Zellpopulationen für die Gewährleistung zentraler Hirnfunktionen wie der Informationsverarbeitung ist seit langem evident (Rolls et al. 1979; Bartus et al. 1982; Stewart et al. 1984; Flicker et al. 1985; Aigner und Mischkin 1986; Metherate et al. 1987). Nachfolgende Studien ergaben, dass aufsteigende cholinergere Neurone weitere allgemeine Hirnfunktionen gewährleisten. Hierzu gehören die Kontrolle verschiedener Verhaltensweisen (Stewart et al. 1984; Baghdoyan et al. 1984) sowie kortikale Prozesse wie Aufmerksamkeitssteuerung, Lernen und Gedächtnis (Rolls et al. 1979; Bartus et al. 1982; Flicker et al. 1985; Aigner und Mischkin 1986; Wenk et al. 1987; Metherate et al. 1987). Diese Ergebnisse belegten die große Bedeutung von Störungen des cholinergere Systems für die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimerschen Demenz. So wurde in den späten 1970er und frühen 1980er Jahren die Erforschung dieses Systems auch für klinische Fragestellungen attraktiv.

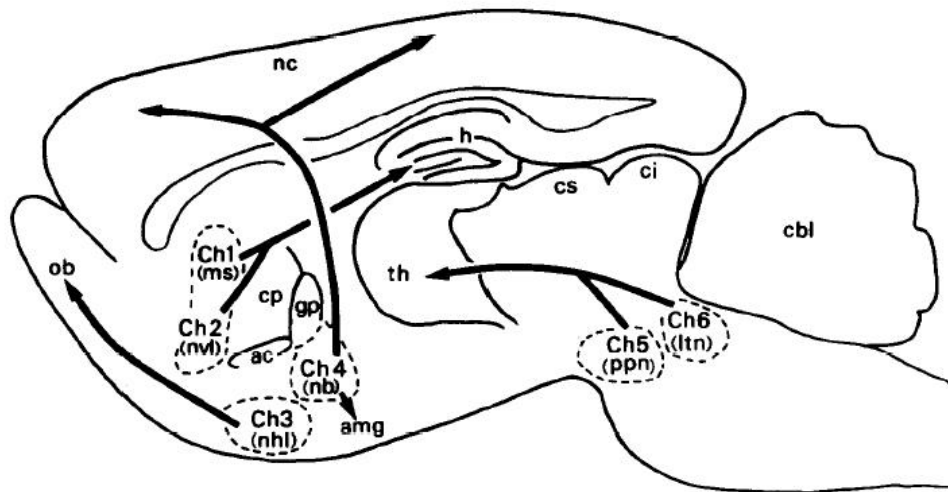
Dutzende Pharmaka wurden getestet, um deren Fähigkeit zum Zellschutz cholinergere Neurone zu erfassen (Giacobini 2002). Jedoch ist es bisher nicht möglich, die Vulne-

rabilität dieser Zellpopulationen effektiv und längerfristig zu verhindern. Essentielle verbleibende Fragen betreffen die Problematik, ob die cholinergen Neuronen unter pathologischen Bedingungen einen bevorzugten Angriffspunkt darstellen sowie ob und in welchem Umfang es nach deren Zerstörung zur Regeneration kommt. Voraussetzung für die Beantwortung dieser Fragen ist die genaue Kenntnis von morphologischen und funktionellen Aspekten der cholinergen Neuronen, einschließlich ihrer anatomischen Organisation in Kerngebiete, Innervationen durch andere Neuronentypen sowie physiologische und unphysiologische Stimulation (Godyn et al. 2016).

Ein sich im Aufbau befindlicher Ansatz ist die Stammzelltherapie, die große Bedeutung für die Behandlung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen erlangen könnte. Im Moment befindet sich die Stammzelltechnologie noch in ihren Anfängen, jedoch zeigt sich ein schnelles Fortschreiten, welches ein großes Potential sowohl in der direkten als auch indirekten Alzheimertherapie voraussagt. In Kombination mit den Daten der Alzheimerforschung aus den vergangenen Dekaden verspricht die Stammzelltherapie eine neue Generation in der Behandlung der AD (Lee et al. 2016).

Das basale Vorderhirn enthält vier Kerngebiete mit cholinergen Projektionsneuronen, Ch1-Ch4 (Mesulam 1983). Diese in Abb. 1.5 schematisch dargestellten Kerngebiete liegen als lockere Ansammlungen vor und stehen in Verbindungen zu anderen Kerngebieten und Zellfasern, die entsprechende Regionen durchziehen. Wesentliche Parameter für die Klassifizierung cholinergischer Neurone im Vorderhirn nach Mesulam (1983) sind ihre Projektionsbeziehungen zu neokortikalen Arealen im Telenzephalon. Cholinerge Neurone des MS (Ch1) und vDBB projizieren hauptsächlich in den Hippokampus. Eine wichtige Leitungsbahn vom hDBB (Ch3) führt zum Bulbus olfactorius sowie zum piriformen, zingulären und entorhinalen Kortex. Die Ch4-Region wird vorwiegend vom NPM und MBN gebildet und projiziert zum Neokortex und zur Amygdala.

Der Großteil des Azetylcholins, das im Striatum freigesetzt wird, unterliegt der Beeinflussung striataler cholinergischer Interneurone. Die laterodorsalen und pedunculopontinen Nuklei (LDT/PPN) im Hirnstamm sind maßgeblich an cholinergen Projektionen beteiligt (Dautan et al. 2014). Diverse Untergruppen des PPN/LDT-Komplexes sind eingebunden in die Weiterleitung cholinergischer Signale zum sensomotorischen und limbischen Kortex. Von diesen Regionen wiederum erfolgt die cholinerge Innervation des Thalamus und des ventralen Mittelhirns. Somit kann vom aufsteigenden cholinergen System aus - sowohl direkt über striatale Innervation als auch indirekt über den thalamostriatalen und mesostriatalen Weg - die striatale Aktivität



**Abbildung 1.5:** Organisation cholinergischer Leitungsbahnen im Rattenhirn. Schematische Darstellung eines medialen Sagittalschnitts.

Bei der Betrachtung von rostral nach kaudal finden sich folgende Kerngebiete: mediales Septum (MS), Kerne des horizontalen und vertikalen Schenkels des diagonalen Broca-Bandes (h/v DBB), der Nucleus praeopticus magnocellularis (NPM), die Substantia innominata (SI) sowie der Nucleus basalis magnocellularis (MBN), der dem humanen Nucleus basalis Meynert entspricht. Außerhalb des basalen Vorderhirns in der Formatio reticularis des Mesenzephalon befinden sich die Ch5-Ch6-Regionen mit dem Nucleus pedunculopontinus und Nucleus tegmentalis posterolateris. Nach Mesulam et al. 1983.

reguliert werden.

Die Entwicklung neuer Therapeutika, die z.B. modulierend an cholinergen Rezeptorsubtypen eingreifen, könnte einen großen Fortschritt in der Therapie verschiedener zerebraler Erkrankungen, wie Morbus Parkinson oder Medikamentenabhängigkeit bedeuten. Voraussetzung dafür ist das Verständnis von Funktion und Anatomie cholinergischer striataler Interneurone einhergehend mit gezieltem Eingreifen in das cholinerge System mittels Rezeptormodulatoren.

Die künftig notwendige, bessere Analyse der synaptischen Verschaltung zerebraler Netzwerke sollte helfen tiefgreifendere Erkenntnisse zu gewinnen. Hierbei kommt auch einer detaillierten Analyse der cholinergen Innervation des Striatums eine besondere Bedeutung zu.

### 1.5.2 Katecholaminerges System

Katecholamine sind eine Gruppe von organischen Verbindungen, die einen Benzenring mit zwei benachbarten Hydroxylgruppen sowie einer gegenüberliegenden Aminogruppe besitzen (siehe auch Abb. 1.6). Zu den physiologisch wichtigsten Katecholaminen

gehören Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Katecholamine dienen als Hormone und Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem, werden aber auch zu therapeutischen Zwecken künstlich hergestellt. 1939 gelang es den Pharmakologen Peter Holtz und Hermann Blaschko, die Biosynthese der körpereigenen Katecholamine im Nebennierenmark aufzuklären (Molinoff und Axelrod 1971). Startpunkt der Synthese stellt die Aminosäure L-Tyrosin dar, die durch das geschwindigkeitsbestimmende Markerenzym Tyrosinhydroxylase (TH) zu L-Dopa umgewandelt wird. In weiteren Reaktionsschritten entstehen durch Hydroxylierung und Methylierung erst Dopamin, dann Noradrenalin und schließlich Adrenalin. Abbildung 1.6 zeigt eine schematische Darstellung der Katecholaminsynthese.

Seit dem Nachweis der Aktivität von Katecholaminen im zentralen Nervensystem in den 1950er Jahren (Bertler et al. 1959; Carlsson 1959; Montagu 1956; Vogt 1954) wurde diesen Wirkstoffen große Beachtung geschenkt, vor allem da man früh ihre Beteiligung bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel Morbus Parkinson, erkannte. Sie steuern als Neurotransmitter eine Vielzahl von Funktionen des zentralen Nervensystems. Dazu zählen im Wesentlichen die Kontrolle von Motorik, Kognition, Emotionen, Gedächtnis und hormonelle Regulation. Auf zellulärer Ebene sind Katecholamine an der Regulation von Ionenkanälen beteiligt. Dabei ist es abhängig vom Rezeptortyp, ob es zu einem Öffnen oder Schließen der Kanäle kommt (Nicoll et al. 1990). Aus ihrer Dysfunktion resultieren verschiedene Störungen, darunter vor allem neurologische und neuropsychiatrische Krankheiten wie Morbus Parkinson, Depressionen oder Angst- und Appetitstörungen (Nagatsu et al. 1984; Rubin et al. 1985; Davidsson et al. 1987; Oades 1987).

Die zentralen noradrenergen Bahnen ziehen überwiegend von der im Hirnstamm gelegenen Pons aus und senden ihre Axone sowohl nach kaudal, zur Medulla oblongata, als auch nach rostral, zum Telenzephalon. Diese Neurone steuern kognitive Funktionen wie Aufmerksamkeit und Erinnerung, aber auch vegetative Prozesse wie die neuroendokrine und autonome Regulation (Robbins und Everitt 1995), was Schmerzhemmung, Schlafverhalten und Angstentwicklung umfasst. Jedoch ist noch immer unklar, welche Rolle Katecholamine bei der Modulation nicht-motorischer Funktionen im Bereich von Striatum und Amygdala spielen.

Veränderungen in der TH-Aktivität sind beteiligt an der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder, wie dem Segawa-Syndrom, der Parkinsonschen Erkrankung oder der Schizophrenie (Godwill et al. 1997; Thibaut et al. 1997).

Weil sich Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase in Vorarbeiten am PFI als sensitive

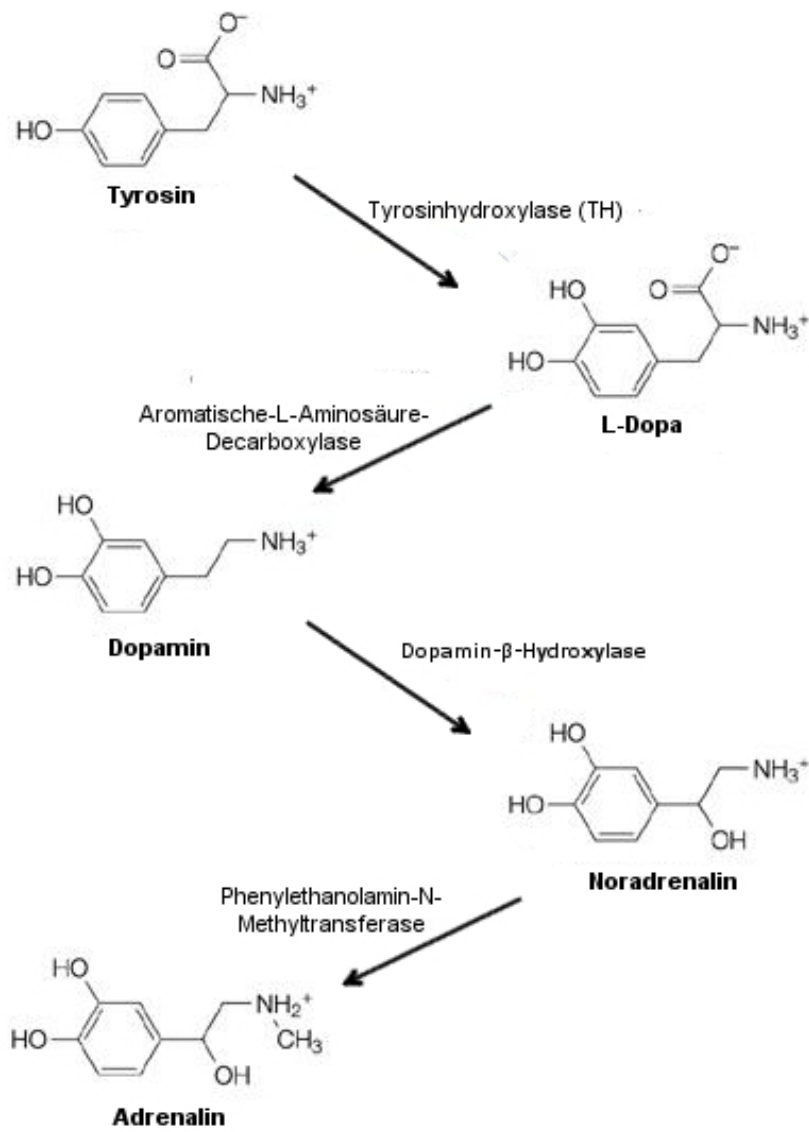


Abbildung 1.6: Katecholaminsynthese. Nach Goridis und Rohrer 2002.

und robuste Marker erwiesen haben (Brauer et al. 2000; Riedel et al. 2002), wurden diese Immunreagenzien in der vorliegenden Studie verwendet. Der eingesetzte Kaninchen-Antikörper ist hochspezifisch und erfasst keine serotonergen Zellen.

## 1.6 Tiermodelle

Um eine biochemische, histologische und pathologische Analyse für Schlaganfall-relevante Veränderungen im Gehirn vorzunehmen, ist es wichtig, dass Untersuchungen an Geweben *post mortem* mit kurzer Verweilzeit vor dem Einfrieren oder ihrer Fixierung vorgenommen werden. Humanes Material kann diese Forderungen meist nicht erfüllen. Daher bedient man sich verschiedener Tiermodelle, in denen unter standardisierten Bedingungen das kontrollierte Ein- bzw. Ausschalten bestimmter Variablen erfolgt. Dabei ist es möglich, den Zeitpunkt der Ischämie genau zu terminieren und Untersuchungen gezielt in verschiedenen Ebenen der Hirnkompartimente vorzunehmen. Gerechtfertigt wird dieses Zurückgreifen auf Tiermodelle jedoch nur, da Parallelen zwischen den physiologischen, biochemischen und pathophysiologischen Vorgängen in verschiedenen Säugetieren und dem Menschen bestehen (Shellshear 1927).

Um die im Tiermodell gewonnenen Daten auf den Menschen übertragen zu können, müssen die tierexperimentell induzierte Ischämie und die Ischämie im menschlichen Gehirn ähnliche Histologie und Klinik aufweisen. Nur dann ähneln sich auch biochemische und pathophysiologische Veränderungen im Patienten und im Tiermodell hinreichend. Die Läsionen sollten hinsichtlich ihrer Größe und Lage weitgehend reproduzierbar sein. Bevorzugt wird beim Ischämiemodell auf Nagetiere zurückgegriffen. Hierbei sind Ergebnisse zu erwarten, die denen des Menschen entsprechen (Endres und Dirnagl 2002; Hossmann 2004; Dirnagl et al. 2014). Eine verbesserte Vergleichbarkeit wird dadurch garantiert, dass die Tiere alle aus einer Inzuchtstammlinie mit hoher genetischer Homogenität entstammen.

Risikofaktoren wie Vorerkrankungen, die sowohl das Ausmaß als auch das Resultat der Ischämie beeinflussen, werden durch die Verwendung standardisierter Tierstämme eliminiert. Jedoch ist dies auch gleichzeitig ein Schwachpunkt von Tiermodellen, da bei Patienten bei fast jedem Ischämieereignis auch ein gewisser Pool an Risikofaktoren oder Vorerkrankungen vorhanden ist, der das Outcome beeinflusst. Dieser Umstand wird selten berücksichtigt, so dass eine „Eins-zu-eins-Übertragung“ der Ergebnisse nicht möglich ist.

Durch genetisch modifizierte Tiere (im Besonderen Mäuse) ergeben sich eine Vielzahl



Möglichkeiten, die Rolle einzelner Gene herauszufinden (Kinouchi et al. 1991; Endres und Moskowitz 1998; Chan 2001; Wang et al. 2008), wobei vor allem transgene Tiere und sogenannte Knock-out(K.o.)-Mäuse untersucht werden.

Neben der Untersuchung von Wildtyp-Mäusen ist für die Analyse Alzheimer-artiger Veränderungen im zerebralen Kortex ein altersentsprechendes transgenes Mausmodell notwendig, das Mutationen aufweist, die in Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung stehen. Die Generierung eines triple-transgenen Modells, von sogenannten 3xTg-Mäusen, erfolgte durch die Arbeitsgruppe um die Drs. Frank M. LaFerla and Salvatore Oddo (Irvine, University of California, USA; Oddo et al. 2003). Hierbei wurden die Eizellen einer homozygoten Knock-in-Maus, die eine PS1<sub>M146V</sub>-Mutation trägt, gleichzeitig mit zwei unabhängigen Transgenen mit den Mutationen APP<sub>Swe</sub> und Tau<sub>P301L</sub> injiziert. Die Transgene wurden in die Wirts-DNA eingeschleust, womit genetisch gleiche Mäuse entstanden. Da es bei diesem Versuchsaufbau nicht zur unabhängigen Vererbung der Transgene kommt, können die Tiere wie einfach transgene Tiere gezüchtet werden. Es wurde somit die biologische Variabilität reduziert, die bei Kreuzung zweier unabhängiger Linien unvermeidlich gewesen wäre. Die mutierten humanen Transgene stehen unter Kontrolle des Neuronen-spezifischen Thy1.2-Regulators und werden somit nur im zentralen Nervensystem exprimiert (Oddo et al. 2003). Die für alle drei Allele homozygoten Mäuse sind fruchtbar, zeigen initial keine schwerwiegenden Abnormalitäten oder Verhaltensauffälligkeiten und erreichen ein Alter von bis zu 2 Jahren.

Die Mutation im APP- und Presenilin-Gen führt zur Überexpression vom jeweiligen Konstrukt und somit zur Überproduktion der APP- und PS1-Varianten mit gleichzeitiger Erhöhung der parenchymalen A $\beta$ -Belastung. Die Translation der Transgene zeigt sich begrenzt auf das zentrale Nervensystem, insbesondere auf die Alzheimer-relevanten Regionen Hippokampus und zerebraler Kortex. In diesem Konstrukt kommt es zum progressiven Anstieg der A $\beta$ -Plaques mit begleitender intrazellulärer Immunreaktivität bereits innerhalb von 3 bis 4 Monaten (Malm et al. 2011). Nach dem 10. Lebensmonat wurde im Hippokampus hyperphosphoryliertes Tau detektiert. Die Tauopathie mit TauP301L-Mutation ist assoziiert mit frontotemporaler Demenz und Parkinson-typischen Symptomen. Bei entsprechender Mutation kommt es zur gesteigerten Tau-Expression bereits 3 Wochen nach Injektion. Von Klein et al. (2004) durchgeführte Analysen ergaben klar nachweisbare Neurofibrillen in 4 Monate alten Mäusen. 'Pretangle'-Strukturen ließen sich bereits in 2 Monate alten Tieren detektieren.

Die altersabhängige  $\beta$ -Amyloidose und Tau-Hyperphosphorylierung in 3xTg-Mäusen wurde außer von Oddo et al. (2003a, b) auch von Mastrangelo und Bowers (2008) sowie Oh et al. (2010) gründlich analysiert und war auch Gegenstand von Vorarbeiten am PFI (Härtig et al. 2010a, b, 2014). Hierbei wurde für 3xTg-Mäuse eine altersabhängige Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid überwiegend im zerebralen Kortex, im Hippokampus und der Amygdala nachgewiesen.

3xTg-Mäuse wurden bereits für experimentelle Schlaganfallstudien genutzt; Hawkes et al. (2013) beschrieben z.B. für phosphoryliertes Tau keine Unterschiede zwischen dem von der Ischämie betroffenen Hippokampus im Vergleich zum kontralateralen Hippokampus.  $\beta$ -Amyloid könnte eine wichtige Rolle im Antwortverhalten von Blutgefäßen spielen, die vom ischämischen Ereignis betroffen sind. Dieses Phänomen kommt mehr zum Tragen in Regionen, in denen die  $\beta$ -Amyloid-Konzentrationen hoch sind und/oder wo die  $\beta$ -Amyloid-Transportmechanismen an der Blut-Hirn-Schranke nicht funktionieren (Hawkes et al. 2014; Morris et al. 2016). Zudem wurden in den 3xTg-Mäusen Veränderungen im Gefäßsystem detektiert. In diesen Arbeiten fehlten jedoch Daten zu den Auswirkungen experimentell induzierter Ischämie auf Wechselwirkungen zwischen Gefäßen und sie innervierender Nervenfasern sowohl in 3xTg- als auch in Wildtyp-Mäusen.

## 2 Zielstellung

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, im Tiermodell lokale und altersbedingte Effekte der zerebralen Ischämie mit anschließenden Gefäß- und Nervenfaserveränderungen in nativen sowie in komorbiden Mäusen mit Alzheimer-artigen Veränderungen zu charakterisieren. Hierzu sollten die Auswirkungen einer experimentell induzierten zerebralen Ischämie auf cholinerge und katecholaminerge Nervenfasern, die als wichtige Neurotransmittersysteme im zentralen Nervensystem gelten, analysiert werden.

Zur experimentellen Induktion des Schlaganfalls sollte auf ein patientennahes Mausmodell, das Filamentmodell, zurückgegriffen werden. Für die beabsichtigten semiquantitativen Analysen sollten neben triple-transgenen (3xTg) Mäusen mit altersabhängiger  $\beta$ -Amyloidose und Tau-Phosphorylierung auch altersgleiche Wildtyp-Mäuse dienen. Neben diesen beiden Gruppen 3 Monate alter Tiere war auch die Untersuchung 12 Monate alter Wildtyp- und 3xTg-Mäuse vorgesehen, um erwartete Alterseffekte zu berücksichtigen. Beabsichtigt war die Analyse von mindestens 6 Individuen aller 4 Tiergruppen, um eine Semiquantifizierung von Daten zu ermöglichen.

Vorgesehen war die semiquantitative Analyse cholinergischer und katecholaminergischer Nervenfasern hinsichtlich ihrer Dichte, Intensität sowie Diskontinuität. Zudem erfolgte die quantitative Untersuchung von Gefäßdichte und -intensität.

Hauptziel waren Erkenntnisse zur Vulnerabilität cholinergischer und katecholaminergischer striataler Systeme. Zu klären war, wie sich kurzzeitig nach einem ischämischen Ereignis die neuronalen Fasern verändern und ob bereits direkt nach einem Schlaganfallereignis gravierende Veränderungen eingetreten sind, die eine erfolgreiche Intervention ausschließen. Darüber hinaus sollten mit Fluoreszenz-Dreifachmarkierungen Alzheimer-typische Veränderungen in 3xTg-Mäusen verifiziert werden. Ein weiteres Ziel waren qualitative Daten zu räumlichen Lagebeziehungen zwischen Basalmembranen und Endothelzellen sowie neuronalen Faserendigungen. Abschließend vorgesehen war die simultane Darstellung ischämiebedingter Veränderungen der Gefäßkontakte sowohl cholinergischer als auch katecholaminergischer Fasern.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Studie wurde von Mäusen beider Geschlechter nach experimentell induziertem Schlaganfall die Vorderhirnregion analysiert. Drei und 12 Monate alte Sv129/B6 Wildtyp-Mäuse wurden mit altersentsprechenden triple-transgenen (3xTg) Tieren mit jeweils einem Tag Überlebenszeit nach dem induzierten Ischämieereignis verglichen. Die Tiere sind hinsichtlich des Knock-in-Konstrukts für Presinilin-1 (M146V) homozygot (Oddo et al. 2003) und tragen zwei mutierte menschliche Transgene: APP (Swedish mutation) und Tau-P301L. Um die forcierte Expression dieser Proteine zu erreichen, wurde der "neuronenspezifische" Maus-Thy1-Promoter verwendet. Zudem wurden drei 2 Jahre alte 3xTg-Mäuse einbezogen, um altersabhängige Alzheimer-typische Veränderungen für speziell diese Mäuse darzustellen (Oddo et al. 2003; Härtig et al. 2010a, b, 2014).

Alle Mäuse wurden bereitgestellt durch das Medizinisch-Experimentelle Zentrum (MEZ) der Universität Leipzig. Die Zucht beruht auf im Jahr 2005 erhaltenen Brutpaaren von Dr. Frank M. LaFerla und Dr. Salvatore Oddo (University of California, Irvine, CA, USA). Die Durchführung der Versuche erfolgte entsprechend den Europäischen Richtlinien zur Regelung für Tierversuche (86/609/EEC). Die Genehmigung wurde vom Regierungspräsidium Leipzig als Tierversuchsvorhaben (TVV) 24/10 erteilt.

### 3.1.2 Chemikalien

**Tabelle 3.1:** Verwendete Chemikalien und Hersteller bzw. Lieferanten

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| AlexaFluor647-Streptavidin                      | Dianova, Hamburg            |
| Biotinyliertes <i>Solanum tuberosum</i> -Lektin | Vector, Burlingame, CA, USA |
| Cy2-Esel-anti-Kaninchen IgG                     | Dianova                     |
| Cy3-Esel-anti-Ziege IgG                         | Dianova                     |
| DyLight649-Streptavidin                         | Dianova                     |
| Eiweißglyzerin                                  | Hollborn & Söhne, Leipzig   |
| Entellan  | Merck, Darmstadt            |
| Eselnormalserum                                 | Dianova                     |
| Kaninchen-anti-Aquaporin 4                      | Alomone, Jerusalem, Israel  |
| Kaninchen-anti-Tyrosinhydroxylase               | Merck Millipore             |
| Natriumazid                                     | Merck                       |
| Natriumchlorid                                  | Carl Roth, Karlsruhe        |
| Paraformaldehyd                                 | Merck                       |
| Saccharose                                      | Carl Roth                   |
| Schaf-anti-TH                                   | Abcam, UK                   |
| Triton X-100                                    | Ferak, Berlin               |
| Toluol  | Merck                       |
| Wasserstoffperoxid                              | Merck                       |
| Ziege-anti-Cholinazetyltransferase              | Merck Millipore             |
| Ziegennormalserum                               | Dianova                     |

### 3.1.3 Lösungen

**Tabelle 3.2:** Verwendete Lösungen und Hersteller

|  |           |
|--|-----------|
| Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 0,1 M, pH 7,4 (TBS)      |           |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)                  | Carl Roth |
| + Natriumchlorid, 0,85 % [w/v]                           | Carl Roth |
| mit 12 N Salzsäure (HCl, 37 %-ig) auf pH 7,4 eingestellt |           |
| Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, 0,1 M, pH 7,4 (PBS)  |           |
| Natriumdihydrogenphosphat                                | Carl Roth |
| + Dinatriumhydrogenphosphat                              | Carl Roth |
| + Natriumchlorid 0,9%                                    |           |

## 3.2 Methoden

Die vorliegende Arbeit basierte auf einer experimentellen Tierversuchsstudie am Mausmodell. Die operative Okklusion der Arteria cerebri media verursachte hierbei eine fokale zerebrale Ischämie, die einen humanen Schlaganfall nachahmen soll. Als Grundlage diente das permanente MCAO (middle cerebral artery occlusion)-Modell. Die fokale zerebrale Ischämie wurde mittels des Fadenmodells induziert. Dies wurde von Longa et al. (1983) erstmals beschrieben und geringfügig nach Michalski et al. (2009) modifiziert. Die Blutversorgung der Arteria carotis media wurde von der Arteria carotis externa kommend mittels eines dünnen Polyethylenkatheters mit konischem Ende unterbrochen. Dafür wurde ein standardisiertes, silikonbeschichtetes 6-0 Monofilament der Firma Docol (Redlands, CA, USA) über die rechte Arteria carotis externa eingeführt und über die Bifurkation in die Arteria carotis interna bis zum Ursprung der Arteria carotis media vorgeschoben, bis eine Gefäßbiegung bzw. ein Widerstand zu spüren war.

Während der Operation wurden die Tiere mittels Etomidat (33mg/kg Körpergewicht; Hypnomidat, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) narkotisiert. Zusätzlich wurde Lidocain (Xylocitin 1%, mibe, Brehna, Deutschland) als Lokalanästhetikum s.c. injiziert. Um eine narkosebedingte Auskühlung zu vermeiden, wurde während des ganzen Verfahrens per rektaler Temperatursonde die Körperkerntemperatur gemessen und mit Hilfe eines Wärmepads (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) konstant bei etwa 37°C gehalten. Neurologische Verhaltensausfallerscheinungen wurden einen Tag nach Ischämieinduktion mittels eines Punktesystems nach Menzies et al. beurteilt: Einstufung von 0 (= kein Defizit) bis 4 (= ausgeprägtes Defizit), charakterisiert durch ein spontanes Drehen im Kreis zur kontralateralen Seite (Menzies et al. 1992). Um in vorliegende Studie eingeschlossen zu werden, mussten die Tiere ein Ergebnis von mindestens 2 Punkten aufweisen, wodurch eine erfolgreiche unilaterale fokale zerebrale Ischämie angezeigt wird.

### 3.2.1 Gewebeaufbereitung

Vierundzwanzig Stunden nach Infarktinduktion erfolgte die transkardiale Perfusion mit physiologischer Kochsalzlösung und 4%igem phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (PFA). Daraufhin wurden die Gehirne den Schädeln entnommen und über Nacht im gleichen Fixativ nachfixiert, um anschließend mit 30%iger phosphatgepuffertem Saccharoselösung zu äquilibrieren. Die danach eingefrorenen Vorderhirne wurden mit

einem Gefrierschnittmikrotom der Firma Leica weiterverarbeitet. Die Gehirne wurden mittels Tissue Tek (O.C.T. Compound, Sakura, Tokio, Japan) auf dem Objekttisch befestigt und auf  $-40^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, wodurch das Gewebe aushärtete und besser schneidfähig war. Das Schneiden erfolgte dann bei etwa  $-20^{\circ}\text{C}$  von rostral nach kaudal. Die erste Schnittebene stellte jeweils der Schnitt dar, bei dem beide Hirnhemisphären verbunden waren. Angefertigt wurden Zehnerserien mit je acht  $30\mu\text{m}$  dicken Koronalschnitten pro Reagenzglaschen. Zur Lagerung der Schnitte wurde  $0,1\text{ M}$  Tris-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4 (TBS), mit circa  $0,2\%$  Natriumazid als Additiv verwendet.

### 3.2.2 Auswahl der Hirnschnitte

Für die wichtigsten immunhistochemischen Färbungen wurden von allen Tieren Schnittserien mit jeweils jedem zehnten Schnitt bearbeitet. Es resultierten in der Regel drei Objektträger mit jeweils 8 Hirnschnitten. Dabei wurde versucht, stets annähernd gleiche Abschnitte zu verwenden, d.h. je Tier ein Objektträger mit rostralen, medialen und kaudalen Schnittebenen. Die anatomische Auswahl erfolgte mit Hilfe eines stereotaktischen Atlas des Maushirns (Paxinos und Watson 1998).

### 3.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der, in der vorliegenden Arbeit umfangreich eingesetzten, indirekten Immunfluoreszenz wurden zunächst unkonjugierte Primärantikörper eingesetzt, die an das zu markierende Antigen im Präparat binden. Um diese Stelle zu lokalisieren, wurden Sekundärantikörper verwendet, die an ein Fluorophor gekoppelt sind und an den ersten Antikörper, der in diesem Fall die Zielstruktur darstellt, binden. Die applizierten Sekundärantikörper sind spezifisch für Immunglobuline der Klasse G der applizierten Wirtsspezies der Primärantikörper.

Für die semiquantitative Serienauswertung der Hirnschnitte dienten zwei verschiedene Fluoreszenz-Doppelmarkierungen. Als Marker für cholinerge Fasern eingesetzt wurden gegen ChAT gerichtete affinitätschromatographisch gereinigte Antikörper aus der Ziege, die mit Carbocyanin (Cy)3-gekoppelten Esel-anti-Ziege IgG visualisiert wurden. Die Darstellung katecholaminerger Fasern erfolgte mit Kaninchen-Antikörpern gegen Tyrosinhydroxylase, die mit Cy3-gekoppelten Esel-anti-Kaninchen IgG detektiert wurden. Die neuronalen Fasern wurden gegengefärbt mit biotinyliertem *Solanum tuberosum* Lektin (STL, Kartoffellektin) und Cy2-konjugiertem Streptavidin, wobei

im Wesentlichen Gefäße detektiert wurde.

Primär wurde das Gewebe dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgte zur Blockierung unspezifischer Bindungen eine einstündige Inkubation mit 5%igem Eselnormals serum in TBS, 0,3 % Triton X-100 enthaltend (ENSTBS-T), auf dem Schüttler. Eine unspezifische Anfärbung des Gewebes wurde durch die Blockierlösung verhindert, indem die unerwünschte Absorption der Primärantikörper inhibiert wurde.

Das Normals erum wurde nach der Inkubation nicht vollständig ab gespült, so dass eine geringe Schicht auf den Geweben verblieb, wenn im nächsten Schritt für circa 20 h bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert wurde.

Nach dreimaliger Waschung für je 10 Minuten mit TBS wurde das Gewebe 1 h mit einer Mischung von Cy3-konjugierten Antikörpern gegen Ziege-IgG bzw. Kaninchen-IgG sowie Cy2-Streptavidin versetzt. Als Fluorochrome dienten hierbei Carbocyanin Cy2 (grün fluoreszierend nach Anregung mit blauem Licht) und Cy3 (rotfluoreszierend nach "Grünanregung").

Auf viermaliges weiteres Waschen mit TBS für je 10 Minuten folgte eine kurze Spülung mit destilliertem Wasser und anschließendes Aufziehen der Schnitte auf zuvor beschriftete Objektträger. Zur schnelleren Trocknung lagerten die Objektträger bis zum Eindecken mit Entellan in Toluol (Merck) bei 37°C in einer Wärmekammer.

### **3.2.4 Weitere Fluoreszenzmarkierungen für qualitative Analysen**

Neben den Serienfärbungen für semiquantitative Auswertungen wurden weitere Fluoreszenzmarkierungen für qualitative Analysen durchgeführt: Zur Verifizierung Alzheimer-typischer, altersabhängiger Veränderungen erfolgte die Visualisierung von Plaques sowohl durch Cy3-Immunmarkierung als auch durch den Thioflavin-S-Nachweis von  $\beta$ -Faltblattstrukturen kombiniert mit der Detektion von hyperphosphoryliertem Tau durch AT8 und Cy5-Streptavidin. Weitere neuropathologische Veränderungen wurden mit einer Dreifachmarkierung von N-terminal verkürztem Pyroglutamy-A $\beta$ , AT8-immunoreaktivem Phospho-Tau und GFAP (Glial fibrillary acidic protein, Saures Gliafaserprotein)-exprimierenden reaktiven Astrozyten dargestellt.

Durch die simultane Darstellung von Mikroglia, Astrozyten und Gefäßen war ein Screening wichtiger Veränderungen der neurovasculären Einheit im ischämischen Ge-



webe möglich.

Als Marker für Mikroglia diente das kalziumbindende Protein Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), während Astrozyten durch Immunmarkierung von GFAP detektiert wurden und die Detektion der Gefäße lektinhistochemisch mit biotinyliertem STL (*Solanum tuberosum* Lektin, Kartoffellektin) erfolgte.

Eine weitere Dreifachfärbung bestehend aus einer Gefäßdoppelmarkierung mit Kollagen IV für Basalmembranen und STL für Endothelzellen in Kombination mit TH bzw. ChAT zeigte die enge Beziehung der Gefäße mit cholinergen bzw. katecholaminergen Nervenfasern.

Eine Übersicht über die durchgeführten Mehrfachmarkierungen gibt nachfolgende Tabelle (Tab. 3.3).

### 3.2.5 Kontrollfärbungen

Zur Bestätigung der histochemischen Färberesultate war eine Überprüfung sowohl der Reagenzien als auch der Färbemethoden notwendig.

Eine entscheidende Komponente aller Färbesysteme waren die Primärantikörper sowie biotinyliertes STL. Durch deren Weglassen bei ansonsten gleichem Detektionssystem erfolgt eine Negativkontrolle, um sicherzustellen, dass eine positive Anfärbung auch das Ergebnis einer spezifischen Bindung an das zu erfassende Antigen darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden Kontrollschnitte ohne Inkubation mit primären Antikörpern bzw. Lektin, aber ansonsten gleichen Färbeprotokollen unterzogen. Die mikroskopische Auswertung zeigte in den Kontrollgewebeschnitten keinerlei fluoreszenzmarkierte Strukturen.

### 3.2.6 Mikroskopie und Bildgebung

Zur initialen licht- und fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Präparate wurde ein Axioplan-Mikroskop von Zeiss verwendet. Hierbei erfolgte die Fluoreszenzanregung mit einer 50W-Quecksilberdampflampe.

Eine detailliertere Analyse und Dokumentation von Doppel- und Dreifachmarkierungen wurde an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) durchgeführt.

Ein derartiges Mikroskop kann Licht aus unterschiedlichen Ebenen des zu untersuchenden Präparats separieren. Dadurch ist eine dreidimensionale Darstellung der Schnitte schichtweise realisierbar. Die meisten Konfokalmikroskope sind auch Laser-

**Tabelle 3.3:** Mehrfach Immunfluoreszenzmarkierungen

| erster Marker<br>Primärantikörper  | erster Marker<br>Sekundärantikörper * | Zweiter Marker<br>Primärantikörper /<br>Lektin                            | Zweiter Marker<br>Zweitreakgenz * | Dritter Marker<br>Primärantikörper /<br>Lektin             | Dritter Marker<br>Zweitreakgenz * |
|--|---------------------------------------|---|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| Kaninchen-anti-A $\beta$<br>(1:100, Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland) **   | Cy3-Esel-anti-Kaninchen IgG           | Biotinyliertes AT8<br>(1:50, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) ** | Cy5-Streptavidin                  |  |                                   |
| Maus-anti-Pyroglyutamyl-A $\beta$<br>(20 $\mu$ g/ml; Härtig et al. 2010a)          | Cy3-anti-Digoxin ***                  | Biotinyliertes AT8<br>(1:50, Thermo Fisher Scientific)                    | Cy2-Streptavidin                  | Meerschwein-anti-GFAP<br>(1:200; Synaptic Systems)         | Cy5-Esel-anti-Meerschwein IgG     |
| Kaninchen-anti-Iba<br>(1:400; Synaptic Systems)                                    | Cy3-Esel-anti-Kaninchen IgG           | Meerschwein-anti-GFAP<br>(1:200; Synaptic Systems)                        | Cy2-Esel-anti-Meerschwein IgG     | Biotinyliertes STL<br>(20 $\mu$ g/ml; Burlingame, CA, USA) | Cy5-Streptavidin                  |
| Ziege-anti-ChAT<br>(affinitätsgereinigt; 1:50, Merck Milipore, Billerica, CA, USA) | Cy3-Esel-anti-Ziege IgG ****          | Kaninchen-anti-TH<br>(1:200; Merck Milipore)                              | Cy2-Esel-anti-Kaninchen IgG       | Biotinyliertes STL<br>(20 $\mu$ g/ml; Vector)              | Cy5-Streptavidin                  |
| Ziege-anti-ChAT<br>(affinitätsgereinigt; 1:50, Merck Milipore, Billerica, CA, USA) | Cy3-Esel-anti-Ziege IgG ****          | Biotinyliertes STL<br>(20 $\mu$ g/ml; Vector)                             | DyLight649-Streptavidin           | Kaninchen-anti-Kollagen IV<br>(1:70, Merck Milipore)       | Cy2-Esel-anti-Kaninchen IgG       |
| Schaf-anti-TH<br>(1:200; Abcam, Cambridge, UK)                                     | Cy3-Esel-anti-Ziege IgG ****          | Biotinyliertes STL<br>(20 $\mu$ g/ml; Vector)                             | DyLight649-Streptavidin           | Kaninchen-anti-Kollagen IV<br>(1:70, Merck Milipore)       | Cy2-Esel-anti-Kaninchen IgG       |

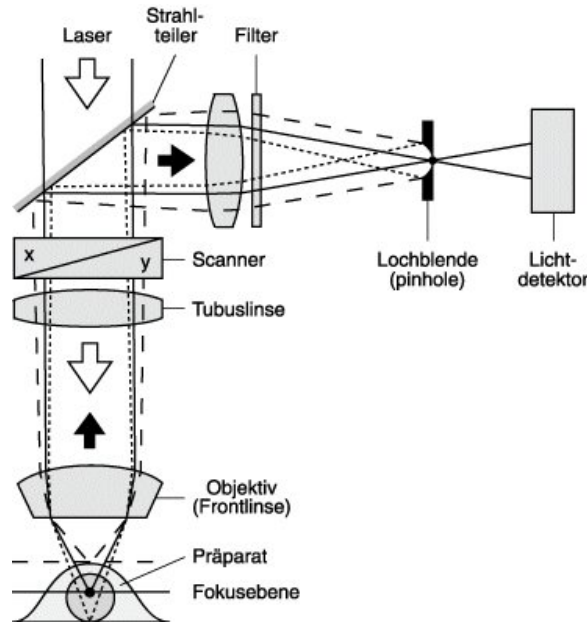
\* Alle Fluoreszenzimmunreagenzien wurden bereitgestellt von Dianova (Hamburg, Deutschland) als Lieferant für Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA) und in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/ml eingesetzt für 1h.

\*\* Thioflavin S-Färbungen wurden angefertigt auf Superfrost-Objektträgern mit anschließender Immunmarkierung von A $\beta$  (Cy3) und AT8 (Cy5).

\*\*\* Anti-Digoxin ist stark kreuzreaktiv mit den Agykon Digoxigenin.

\*\*\*\* Carbocyanin-markierte anti-Ziege-IgG-Antikörper sind kreuzreaktiv mit Schaf-IgG und daher geeignet zur Visualisierung von primären Schaf-Antikörpern.

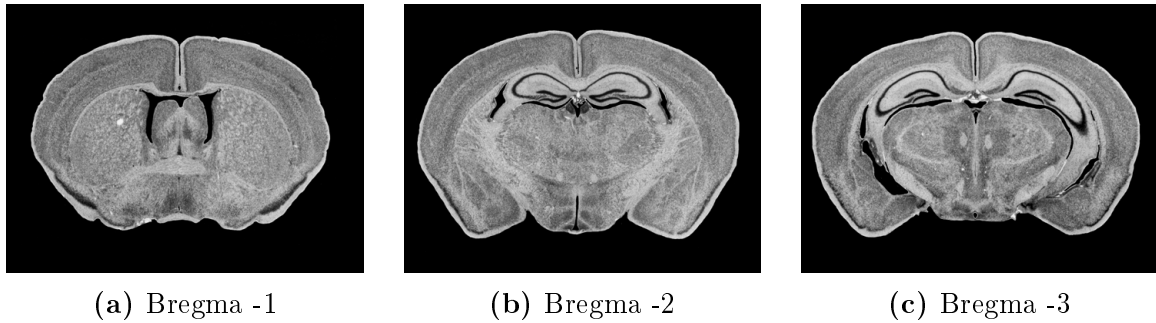
Scanning-Mikroskope, die Laserlicht über einen Scanner sehr schnell zeilenweise in einer Objektebene bewegen. Licht aus dem Brennfleck wird auf einer kleinen Lochblende (pinhole) abgebildet, die sich vor einem Detektor befindet. Das Empfängersignal ist nur auf die Fokusebene beschränkt, Licht ober- und unterhalb dieser Ebene wird ausgeblendet, woraus ein höheres Auflösungsvermögen resultiert.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung eines Konfokalmikroskops. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010.

Ein energiereicher Laser dient hierbei zur Anregung der proteinkonjugierten Fluorophore, der Carbocyanine Cy2, Cy3 und Cy5. Dabei wird Cy2 mittels eines Argonlasers mit einem Exzitationsmaximum bei 488nm angeregt, während der Helium-Neon-1-Laser mit einer Wellenlänge von 543nm Indocarbocyanin (Cy3) detektiert und das Fluorophor Indocarbocyanin (Cy5) durch den Helium-Neon-2-Laser bei einer Wellenlänge von 633nm angeregt.

Die semiquantitative Serienauswertung und Vermessung der Fluoreszenzpräparate erfolgte mit einem Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop BZ-9000E und der zugehörigen Auswertesoftware der Firma Keyence (Osaka, Japan). Es handelt sich dabei um ein kompaktes invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop mit ergonomischem High-Standard-Betrachtungsverfahren.



**Abbildung 3.2:** Ausgewählte Schnittebenen aus dem Maushirn-Atlas. Nach Paxinos und Franklin 1998.

### 3.2.7 Semiquantitative Auswertung

Um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu ermöglichen, wurden zu Beginn auf Grundlage eines Maushirnatlas (Paxinos und Watson 1998) relevante Hirnschnittebenen nach Bregma festgelegt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die gesamte theoretisch mögliche Infarktausdehnung in diesen Ebenen zu finden ist. Die zu mikroskopierenden Schnittebenen waren Bregma -1, Bregma -2 und Bregma -3. Dabei sollte mit Bregma -2 der Schnitt mit der größten ischämischen Infarktläsion dargestellt werden, von dem ausgehend jeweils 300µm nach rostral und okzipital ein korrespondierender Schnitt ausgewählt wurde.

Zur Orientierung im Schnitt wurde zunächst ein Übersichtsbild mit vierfacher Vergrößerung angefertigt. Die Keyence-Software mit Bildzusammensetzungsfunktion ermöglichte rasche multifunktionale Ergebnisse, mit gleichbleibender Helligkeit, vollfokussiert und mit Beseitigung der Fluoreszenzunschärfe. Mit einer integrierten Navigationsfunktion konnten die relevanten Regionen (regions of interest, ROIs) gezielt aufgesucht und im Übersichtsbild markiert werden, um anschließend detaillierte Bilder höherer Vergrößerung (60-fach) anzufertigen.

Pro Schnittebene wurden je 3 ipsi- und kontralaterale Detailaufnahmen erstellt. Die Festlegung der ROIs erfolgte auf der Infarktseite. Hierbei wurde die erste Region direkt im Infarktgebiet, dem Stromgebiet der Arteria cerebri media, platziert. Dies stellte das Areal mit maximalem Gewebeschaden dar. Eine Region im Randbereich der Ischämie wurde als zweite ROI festgelegt. Als dritte ROI wurde ein Areal peripher im Neokortex bestimmt, als primär nicht direkt vom Infarkt betroffenes Gewebe. In der kontralateralen Hemisphäre wurden die ROIs gespiegelt, jedoch häufig leicht nachjustiert, um ein in Position und Gewebestruktur korrespondierendes Bild zu erhalten, damit eine bessere Vergleichbarkeit erreicht wird. Die zu vermessenden Flächen soll-

ten sich in allen analysierten Tieren an gleicher Stelle und Bregma-Ebene befinden. Für die Detailaufnahmen wurden eine 60-fache Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv und eine einheitliche Belichtungszeit gewählt, die für alle Bilder Anwendung fand. Ein erstes Screening ergab dabei, dass sowohl für die Rot- als auch für die Grünfluoreszenz eine Belichtungszeit von jeweils 130/s zu den besten Ergebnissen führte.

Zusammengefasst wurden somit pro Tier eine Übersichtsaufnahme und 18 Einzelaufnahmen (3 Schnitte mit je 6 Bildern) für die weitere Analyse angefertigt.

Für die fluoreszenzmarkierten Nervenfasern ergaben sich 3 verschiedene Messpunkte, wobei qualitativ Faserdichte und -intensität, sowie quantitativ die Diskontinuität der Nervenfasern analysiert wurde. Als Diskontinuität der Nervenfasern wurde definiert, dass sich die Nervenfasern in ihrem Verlauf nicht stets zusammenhängend präsentieren, sondern teilweise mit erheblichen Unterbrechungen zu sehen sind. Hierfür wurde ein ordinalskaliertes Score eingeführt, der den Grad der Unterbrechungen angibt (s.u.). Gefäßdichte und -intensität waren weitere Endpunkte, die bei den mit STL-markierten Gefäßen berücksichtigt wurden.

Alle Messpunkte wurden mit Hilfe der Keyence-Steuersoftware BZ II viewer analysiert. Mit der Auswertesoftware BZ II analyzer wurde sowohl eine Intensitätsmessung der Nervenfasern und Gefäße als auch deren Dichtemessung durchgeführt. Außerdem erfolgte eine qualitative Auswertung der Diskontinuität der Fasern mittels eines zuvor festgesetzten dreistufigen Scores: Stufe „1“ besagt, dass eine hohe Diskontinuität, d.h. ein hoher Grad an Unterbrechungen, vorliegt, bei Stufe „3“ sind wenige oder keine Fasern unterbrochen, und es besteht ein hoher Grad an Kontinuität, während Stufe „2“ einen Mittelwert zwischen Maximum und Minimum beschreibt. Die somit gewonnenen Parameter wurden zur statistischen Auswertung herangezogen.

### 3.2.8 Statistische Analysen

Die Berechnungen wurden durchgeführt mit SPSS Statistics package version 24.0 (IBM Corp.; New York, NY, USA). Zusätzlich zur deskriptiven Statistik wurden der Wilcoxon-Test sowie der Mann-Whitney  $U$  zur Überprüfung der statistischen Signifikanz zwischen den verschiedenen Gruppen eingesetzt. Zudem erfolgte eine Berechnung mittels der Pearson-Korrelationen um Zwischenrelationen innerhalb der verschiedenen Parameter zu erhalten. Ein  $p$ -Wert  $< 0.05$  wurde als statistisch signifikant festgesetzt. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, sofern nicht anders gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

Die in Kapitel 3.2 beschriebenen Methoden sind an Hirnschnitten von 3 und 12 Monate alten 3xTg-Mäusen durchgeführt wurden. Zum Vergleich wurden gleichaltrige Wildtyp-Mäuse herangezogen.

### 4.1 Altersabhängige Alzheimer-artige Veränderungen

Alzheimer-artige altersabhängige Veränderungen in 3xTg-Mäusen (perfundierte im Februar 2016 nach mehr als 10 Jahren Aufzucht in einer separaten Kolonie) wurden durch folgende Dreifachmarkierungen verifiziert. Hippokampi von 2 Jahre alten Mäusen zeigten eine starke Immunreaktivität für  $A\beta$  (Abb. 4.1A), auch ohne eine Vorbehandlung mit Ameisensäure. Die anschließend erfolgte Thioflavin S-Markierung (Abb. 4.1A') visualisierte zahlreiche  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen. Im Übersichtsbild sind Thioflavin-S-positive Strukturen wie zu erwarten überwiegend im Kern  $\beta$ -Amyloid-immunreaktiver Plaques verteilt, wohingegen Phospho-Tau visualisiert mit biotinyliertem AT8 und Cy5-Streptavidin (farbkodiert in blau) in enger Nachbarschaft gefunden wurde, jedoch ohne direkte Kolo-kalisierung (Abb. 4.1A"). Eine weitere Dreifachmarkierung detektierte in Hippokampi von alten 3xTg-Mäusen N-terminal verkürztes Pyroglutamyl- $A\beta$  und AT8-immunpositivem Phospho-Tau umgeben von GFAP-Immunreaktivität in Astrozyten als Komponenten der NVU. Übereinstimmend mit ersterer Methode zeigte sich auch hier Phospho-Tau und  $A\beta$  als AD-typische Merkmale umgeben von reaktiven Astrozyten, die mittels GFAP detektiert wurden (Abb. 4.1B).

## 4.2 Astro- und Mikrogliareaktion

Zur histologischen Charakterisierung des infarzierten Gewebes im Vergleich zur kontralateralen Seite einen Tag nach experimentell induzierter Ischämie erfolgte die simultane Detektion von Astroglia mit gegen GFAP gerichteten Meerschweinchen-Antikörpern während Mikroglia mit Kaninchen-anti-Iba1 nachgewiesen wurde. Mikroglia verfügt über die Fähigkeit zur amöboiden Fortbewegung; nach Aktivierung sammelt sich diese am Ort der Läsion an.

Um bei 3 Monate alten Wildtyp-Mäusen Mikroglia als weitere Komponente der NVU darzustellen, erfolgte eine Mehrfachmarkierung mit Iba1 für Mikroglia und GFAP für Astrozyten in Verbindung mit gefäßständigen STL-Bindungsstellen des Endothels. Im Striatum der kontralateralen Hemisphäre sind Astrozyten mit feinen Fortsätzen eingebettet in ein Netzwerk von Endothelzellen zu erkennen, wohingegen Mikroglia nur schwach markiert ist (Abb. 4.1C). Konträr dazu zeigt sich auf der ipsilateralen Seite eine kräftige Mikroglia-markierung, während die GFAP-Markierung für Astrozyten sehr schwach und die endothelialen Strukturen der Gefäßwände deutlich ausgedünnt erscheinen (Abb. 4.1C').

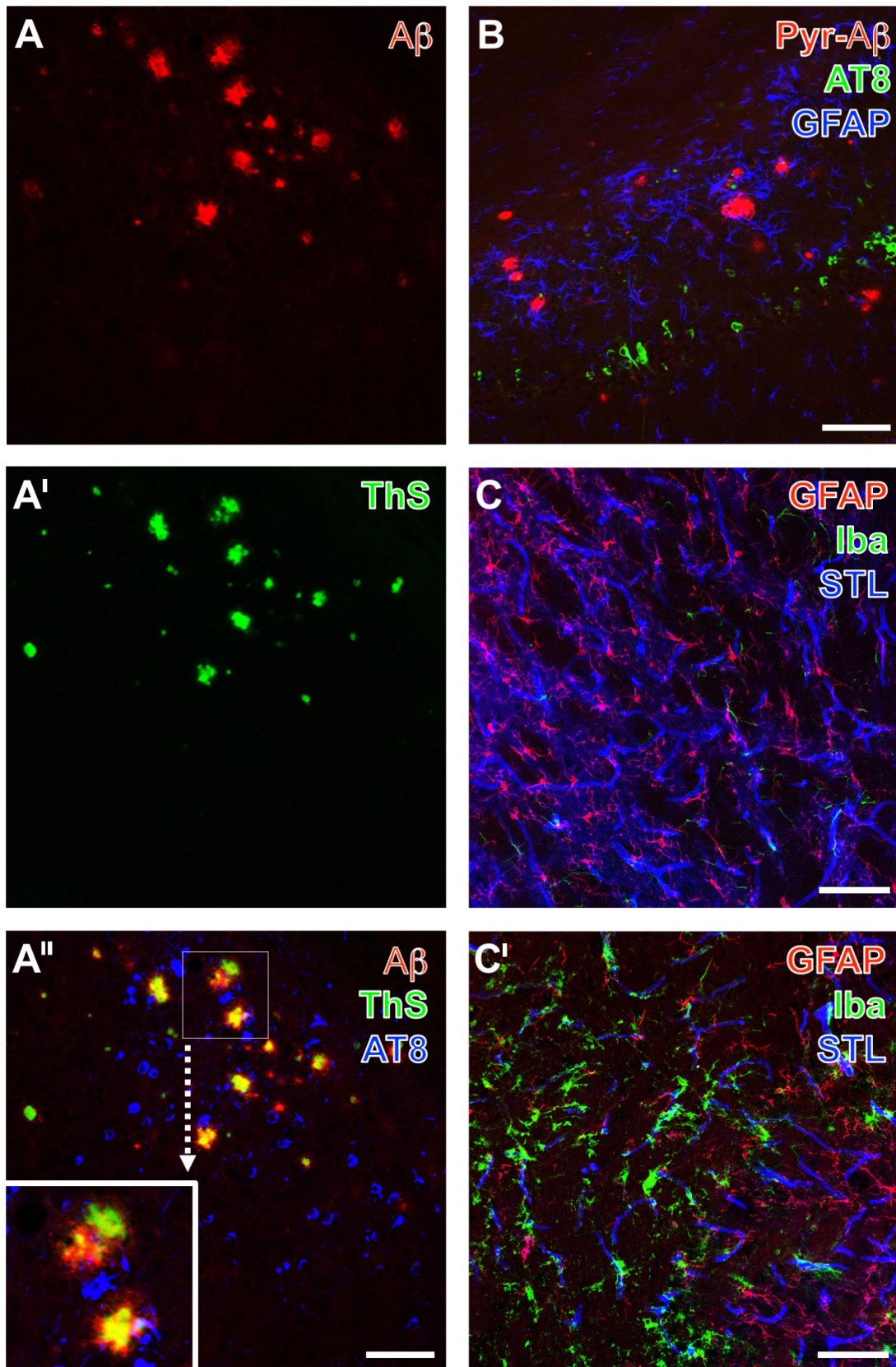


Abbildung 4.1



**Abbildung 4.1:** Verifizierung Alzheimer-artiger Veränderungen in 2 Jahre alten 3xTg-Mäusen (A und B) sowie von gliovaskulären striatalen Veränderungen in 3 Monate alten Wildtyp-Mäusen (C) einen Tag nach Schlaganfall. Ein repräsentatives, mit einem Keyence-Mikroskop erhaltenes Übersichtsbild zeigt neben der Immunmarkierung seniler Plaques in deren Kern auch die Thioflavin S (ThS)-Markierung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (A'). Im Übersichtsbild (A'') wird außerdem durch biotinyliertes AT8 und Cy5-Streptavidin detektiertes hyperphosphoryliertes Tau gezeigt. Die blau farbkodierte Markierung wird sichtbar in enger Nachbarschaft zu senilen Plaques, die nach Überlagerung von A $\beta$ -Immunreaktivität (rot) und Thioflavin-S (grün) im Kern gelb erscheinen. Als weitere neuropathologische Veränderungen zeigt eine Keyence-Aufnahme in (B) die Verteilung von N-terminal verkürztem Pyroglutamy-A $\beta$ -3-40/42 (Cy3, rot), AT8-immunreaktivem Phospho-Tau (Cy2, grün) und GFAP-exprimierenden reaktiven Astrozyten (Cy5, farbkodiert in blau). (C, C') Schlaganfallinduzierte vaskulo-gliale Veränderungen sind mit LSM-Abbildungen repräsentativ dargestellt; simultan markiert sind astrogliales GFAP (Cy2, grün), mikrogliales Iba (Cy3, rot) und Endothelbindungsstellen für das *Solanum tuberosum* Lektin (STL, Cy5, farbkodiert in blau). Die nicht-infarzierte kontralaterale Seite (C) enthält ein schwaches GFAP-Immunsignal und ausschließlich ramifizierte Mikroglia, wogegen Abb. C' ipsilateral die ischämiebedingte Aktivierung der Astrozyten, amöboide Mikroglia und einige STL-markierte Gefäße mit vermindertem Durchmesser demonstriert. Scale bars: A (auch für A'-A'') = 75  $\mu$ m; B = 75  $\mu$ m; C (auch für C') = 75  $\mu$ m.

Nach Michalski et al., J Alzheimers Dis, im Druck.

### 4.3 TH und ChAT - Veränderungen nach Ischämie

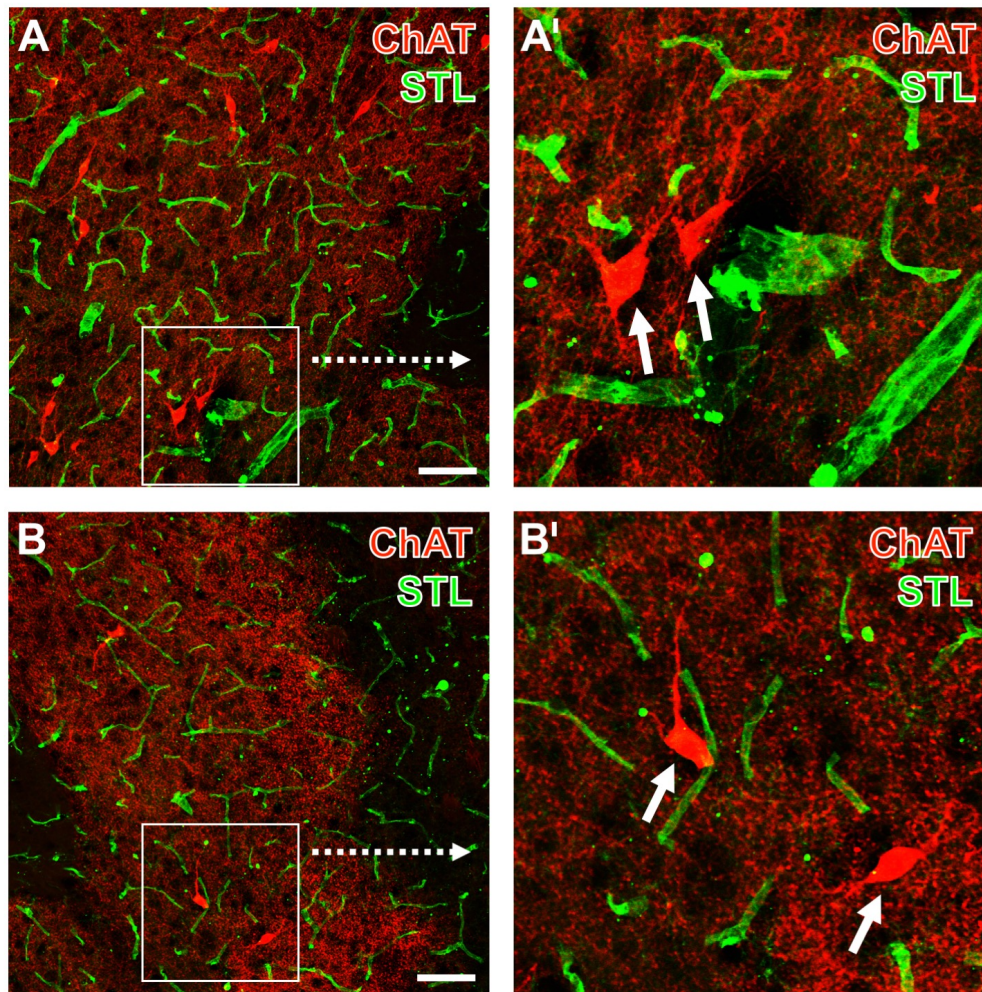
Zur nachfolgenden Analyse der räumlichen Beziehung zwischen cholinergen bzw. katecholaminergen Fasern und STL wurde in Serienschnitten aller 24 Mäuse nach induziertem Schlaganfall die Cy3-Markierung von ChAT bzw. TH mit der Cy2-Markierung von STL kombiniert; als exemplarische Abbildungen siehe Abb. 4.2 und Abb. 4.3.

Bei der Darstellung der Gefäße wurde in vorliegender Arbeit auf den robusten Endothelzellmarker STL zurückgegriffen, der als biotinyliertes Lektin auch Subpopulationen von Mikroglia anfärbt (Härtig et al. 2009).

Schlaganfallbedingte Veränderungen im Färbemuster werden beispielhaft für ChAT und STL im Striatum einer 12 Monate alten Wildtyp-Maus einen Tag nach Ischämie gezeigt. Hierbei dargestellt sind die nicht betroffene kontralaterale Seite (Abb. 4.2A, A') sowie die ischämiebetreffene ipsilaterale Hemisphäre (Abb. 4.2B, B').

Einen Tag nach Ischämieereignis zeigten sich ChAT-immunpositive Interneurone in einem dichten Fasernetzwerk mit vereinzelt Zellkörpern, beide Strukturen oftmals in Kontakt mit STL-markierten Endothelzellen in subkortikalen Regionen sowohl der nicht-betroffenen (Abb. 4.2A, A') als auch der ischämischen Seite (Fig. 4.2B, B'). ChAT-immunpositive Strukturen erscheinen im Ischämiegebiet leicht ausgedünnt und weniger intensiv bezüglich der Cy3-Färbung. Diese Beobachtung lässt sich durch anschließende quantitative Analysen der ChAT-Immunfärbung aller Proben bestätigen: Im Striatum wurde ein signifikanter Rückgang der Färbeintensität und Faserdichte aufseiten der Ischämie-betroffenen Hemisphäre im Vergleich mit der nicht betroffenen Hemisphäre gemessen (Färbeintensität:  $1,63 \pm 1,34$  vs.  $2,25 \pm 1,64$ ,  $p = 0,002$ ; Faserdichte:  $3,04 \pm 7,39$  vs.  $12,13 \pm 13,69$ ,  $p < 0,001$ ; jeweils Wilcoxon-Test). Ein ebenso signifikanter, wenn auch weniger deutlicher Rückgang zeigte sich für die Färbeintensität und Faserdichte in der Infarktgrenzzone der Ischämie-betroffenen Hemisphäre (Färbeintensität:  $2,22 \pm 1,95$  vs.  $2,63 \pm 2,26$ ,  $p = 0,008$ ; Faserdichte:  $10,78 \pm 12,25$  vs.  $18,00 \pm 18,72$ ,  $p = 0,036$ ; jeweils Wilcoxon-Test). Auch im Neokortex, einer Region, die vom verwendeten Schlaganfallmodell nicht direkt betroffen ist, da beim Verschluss der proximalen Arteria cerebri media eine Ischämie lediglich subkortikal auftritt, zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Färbeintensität und Faserdichte in der Ischämie-betroffenen Hemisphäre im Vergleich mit der nicht betroffenen Hemisphäre (Färbeintensität:  $2,25 \pm 2,19$  vs.  $2,71 \pm 2,38$ ,  $p = 0,008$ ; Faserdichte:  $13,71 \pm 16,62$  vs.  $22,71 \pm 18,77$ ,  $p = 0,003$ ; jeweils Wilcoxon-Test).

Abbildung 4.3 zeigt eine typische Doppelfluoreszenzmarkierung für TH und endothe-

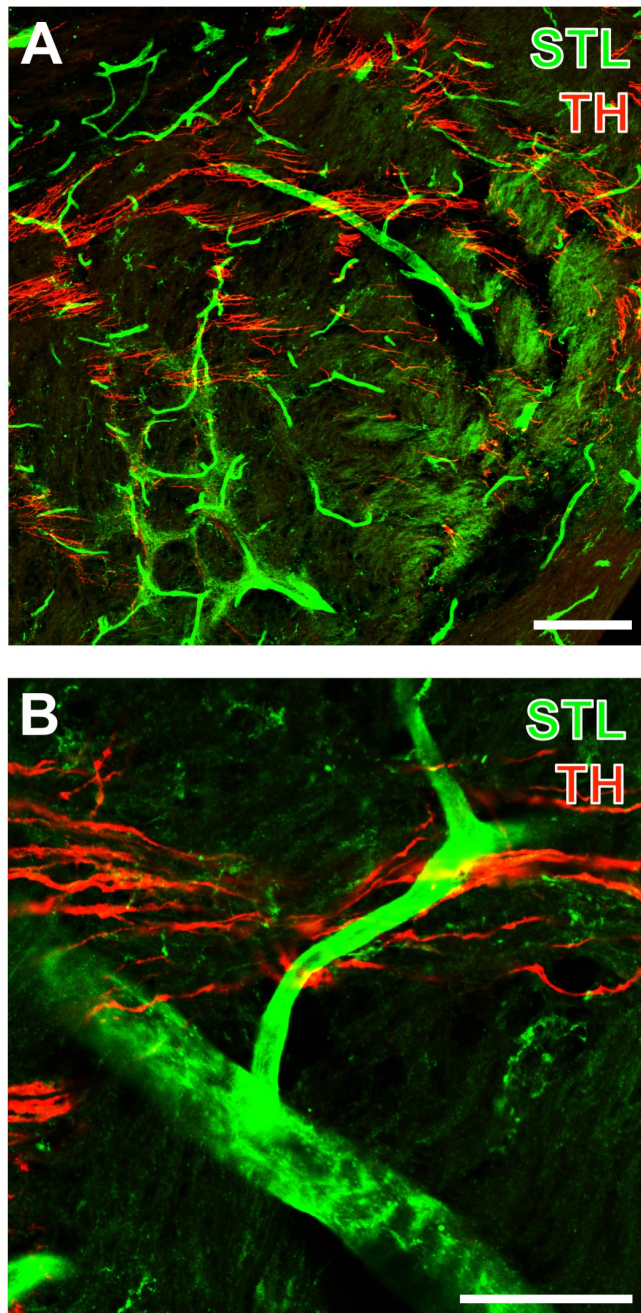


**Abbildung 4.2:** Doppelfluoreszenzmarkierung von Cholinacetyltransferase (ChAT, Cy3, rot) und Endothelbindungsstellen für das *Solanum tuberosum* Lektin (STL, Cy2, grün) im Striatum einer 12 Monate alten Wildtyp-Maus einen Tag nach dem Schlaganfallereignis kontralateral (kontra) zur betroffenen Seite (A, A') und ipsilateral (ipsi; B, B'). Die Bilder mit geringerer Vergrößerung zeigen die Perikarya der cholinergen Interneurone sowie ein dichtes Geflecht der cholinergen Fasern, die oftmals an STL-markierten Endothelzellen lagern. Die Nervenfasern im Ischämiegebiet wurden deutlich größer im Vergleich zu Fasern der kontralateralen Hemisphäre. Zudem erscheinen die STL-markierten Gefäße im Schlaganfallgebiet ausgedünnt. Die Ausschnitte in höherer Vergrößerung (A', B') zeigen die Veränderungen der Fasern noch deutlicher. Scale bars: A, B = 25  $\mu\text{m}$ .  
 Nach Michalski et al., J Alzheimers Dis, im Druck.

liale STL-Bindungsstellen im Striatum einer alten 3xTg-Maus (Abb. 4.3). Die Fasern erscheinen in auffällig paralleler Ausrichtung mit einer engen räumlichen Beziehung zwischen Gefäßen und Nervenendigungen im Schlaganfallgebiet. In der Detailaufnahme (Abb. 4.3B) wird deutlich, wie die katecholaminergen Faserendigungen direkten Kontakt zum STL-markierten Gefäßendothel aufweisen. Eine folgende quantitative Analyse zu inter-hemisphärischen Differenzen der TH-Immunreaktivität zeigte einen signifikanten Rückgang der Faserdichte im Striatum als vorrangig betroffene Region ( $7,78 \pm 10,45$  vs.  $13,41 \pm 16,11$ ,  $p = 0,014$ ; berechnet mit Wilcoxon-Test); dagegen konnte kein eindeutiger Unterschied in Bezug auf die Färbeintensität nachgewiesen werden ( $5,22 \pm 3,81$  vs.  $5,50 \pm 4,03$ ,  $p = 0,271$ ; berechnet mit Wilcoxon-Test). Im ischämischen Grenzbereich war bei der Färbeintensität kein Unterschied zwischen beiden Hemisphären festzustellen ( $5,45 \pm 9,37$  vs.  $5,59 \pm 3,97$ ,  $p = 0,513$ ; berechnet mit Wilcoxon-Test); bei der Faserdichte hingegen konnte eine signifikante Abnahme registriert werden ( $12,78 \pm 19,02$  vs.  $18,95 \pm 22,57$ ,  $p = 0,002$ ; berechnet mit Wilcoxon-Test). Die gemessenen Daten im Neokortex zeigten weder für die Färbeintensität noch für die Faserdichte signifikante Unterschiede im Seitenvergleich von ipsi- und kontralateraler Hemisphäre (Färbeintensität:  $4,54 \pm 3,61$  vs.  $4,73 \pm 3,32$ ,  $p = 0,471$ ; Faserdichte:  $7,64 \pm 15,50$  vs.  $11,09 \pm 21,57$ ,  $p = 0,549$ ; jeweils Wilcoxon-Test).

## 4.4 Neurovaskuläre Veränderungen nach Ischämie

Eine anschließende Dreifach-Fluoreszenzmarkierung von ChAT, TH und STL-Bindungsstellen im Striatum zeigt die pathologischen Veränderungen des ischämie-betroffenen Striatums im Vergleich mit der nicht-betroffenen Seite (Abb. 4.4). Im Striatum der kontralateralen Hemisphäre präsentieren sich ChAT-immunpositive Zellkörper mit angrenzenden Fortsätzen inmitten eines geordneten Netzwerks feiner ChAT- und TH-immunpositiver Fasern (Abb. 4.4A). Diese Strukturen befinden sich eingebettet in einem Netzwerk von STL-positiven Strukturen, die charakterisiert sind durch große Lumen und kontinuierliche Oberflächen. Im Gegensatz dazu präsentiert sich das ipsilaterale Striatum mit deutlich weniger ChAT-immunpositiven Zellkörpern sowie einer geringeren Ausprägung des cholinergen Fasernetzwerks (Abb. 4.4B). Die TH-positiven Strukturen erscheinen erheblich reduziert auf der direkt Infarkt-betroffenen Seite (Abb. 4.4B, rechts im Bild); dahingegen imponieren die angrenzenden Bereiche gesteigert in Bezug auf die Faserdichte (Abb. 4.4B'). Das Fusionsbild



**Abbildung 4.3:** Simultane Fluoreszenzmakierung von Tyrosinhydroxylase (TH, Cy3, rot) und Endothelbindungsstellen für *Solanum tuberosum* Lektin (STL, Cy2, grün) im Striatum einer 3 Monate alten 3xTg-Maus einen Tag nach Ischämie in geringerer Vergrößerung (A) und ein Ausschnitt mit höherer Vergrößerung (B). Gut erkennbar ist die enge räumliche Beziehung zwischen den catecholaminergen Faserenden und den Gefäßen. Scale bars: A = 100  $\mu\text{m}$ , B = 25  $\mu\text{m}$ .

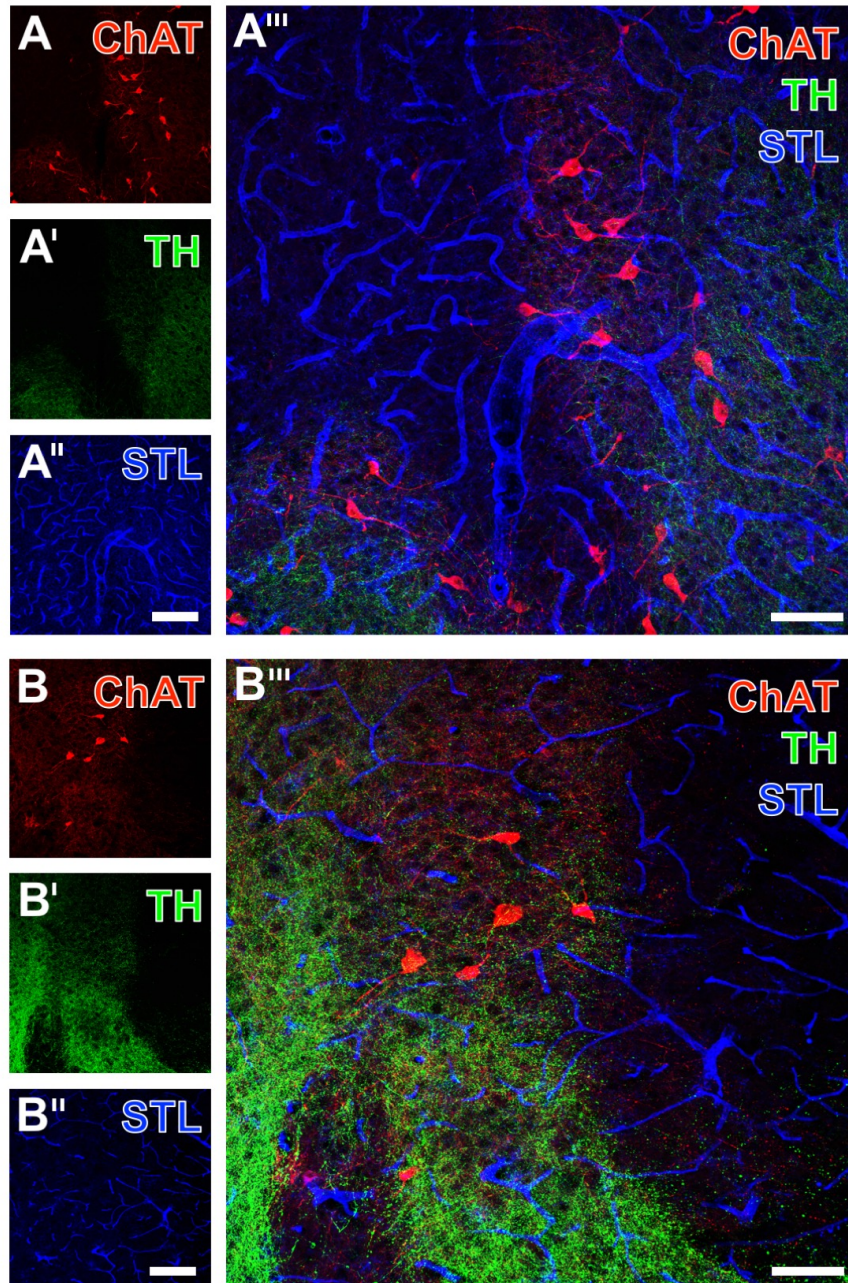
Nach Michalski et al., J Alzheimers Dis, im Druck.

zeigt eindeutig die Veränderungen der beiden untersuchten neuronalen Marker (vorrangig als Rückgang) und des STL-positiven Endothels, das vermindert sowohl in Bezug auf die Anzahl der Endothelzellen als auch auf den Durchmesser der zugehörigen Gefäße (Abb. 4.4B''') erscheint.

Zur besseren Veranschaulichung der Veränderungen von Intensität und Dichte sowohl der neuronalen Fasern als auch der Gefäßkomponenten, erfolgten Korrelationsberechnungen für interhemisphärische Differenzen ( $\Delta$ ) von STL und ChAT, da sich hierbei ausgeprägtere Befunde im Vergleich zu TH (beschrieben im vorherigen Absatz) präsentierten (Intensität: Abb. 4.5A; Dichte: Abb. 4.5B). Auffallend ist, dass alle Korrelationskoeffizienten ein positives Vorzeichen oder eher einen Wert gleich Null zeigen ( $r = -0,012$ ). Daraus schlussfolgern lässt sich, dass es bei beiden Parametern zur gleichsinnigen Veränderung kommt, genauer gesagt: Ein Rückgang der ChAT-Immunreaktivität geht einher mit einem Rückgang der Gefäßkomponenten. Allerdings konnte eine statistische Signifikanz lediglich bei folgenden Interaktionen nachgewiesen werden: Farbeintensität von ChAT in der Ischämiezone ( $p = 0,018$ ) und im Neokortex ( $p = 0,001$ ). Dagegen zeigten die Farbeintensität im Grenzbereich ( $p = 0,187$ ) und in allen Regionen hinsichtlich Faserdichte ( $p$ -Werte zwischen 0,114 und 0,956) eine nicht signifikante Tendenz.

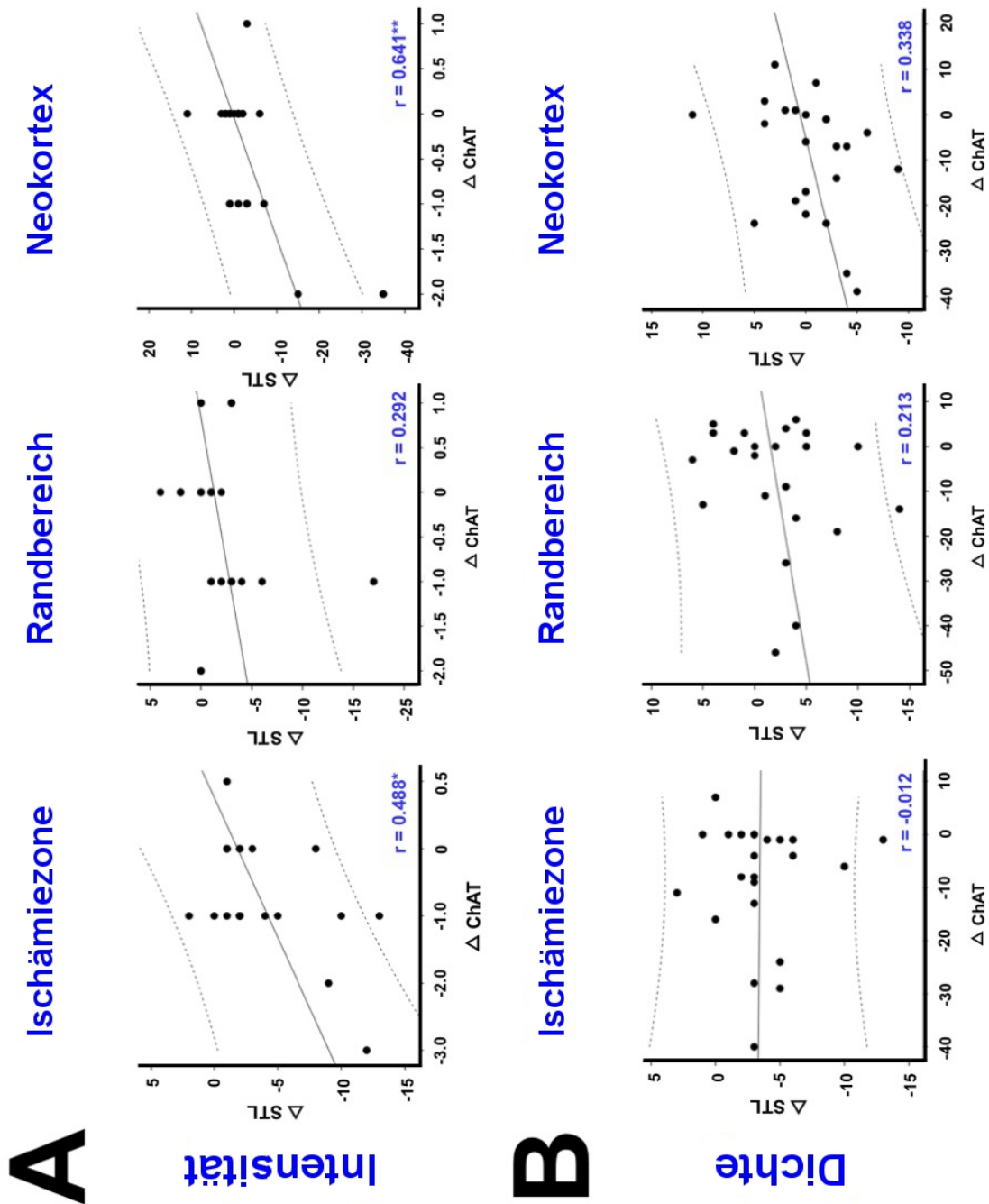
Die in Abbildung 4.2 und 4.3 sichtbare parallele Anordnung der ChAT- und TH-immunpositiven Fasern sowie die enge räumliche Beziehung zum Gefäßsystem und direkte Kontaktaufnahme zum Endothel, motivierten zur Durchführung eines weiteren Experimente fokussiert auf die neurovaskuläre Kopplung, z.B. als direkte Beziehung der Faserendigungen zur Gefäßoberfläche. Deshalb wurde eine Dreifach-Fluoreszenzmarkierung von ChAT (Abb. 4.6A) bzw. TH (Abb. 4.6B) im ischämischen Striatum in Kombination mit STL und Kollagen IV als Hauptkomponente von Basalmembranen und somit Gefäßkomponente der NVU durchgeführt. Hierbei zeigte sich die enge regionale Beziehung der entsprechenden neuronalen Strukturen mit dem Gefäßsystem. Vor allem in den Fusionsbildern (Abb. 4.6) sind sowohl die Assoziation von Basalmembranbestandteilen und Endothel als auch der direkte Kontakt zu den ChAT- bzw. TH-positiven Nervenfasern deutlich zu erkennen.





**Abbildung 4.4:** Simultane Darstellung von ChAT, TH und STL-Bindungsstellen im Striatum einer 3 Monate alten Wildtyp-Maus einen Tag nach Schlaganfallinduktion kontralateral der betroffenen Seite (A–A'') und ipsilateral (B–B''). Während Cy3-immunmarkierte cholinerge Zellen kaum Unterschiede zwischen (A) und (B) zeigen, sind ChAT-immunpositive Fasern in der infarzierten Region kräftiger angefärbt. Weiterhin erscheinen Cy2-markierte TH-positive Fasern in der gesunden Hemisphäre (A') deutlich weniger grob im Vergleich zum ischämiebetreffenen Gewebe (B'). STL-markiertes Endothel wirkt auf der nicht betroffenen Seite (A'') etwas dicker als in entsprechenden neuroanatomischen Strukturen ipsilateral. Im Vergleich der Fusionsbilder (A''', B''') wird eine Hochregulierung der TH-Faser-Markierung im Infarktgebiet deutlich. Scale bars: A'', B'' (auch für A, A', B, B') = 150  $\mu\text{m}$ , A''', B''' = 75  $\mu\text{m}$ .

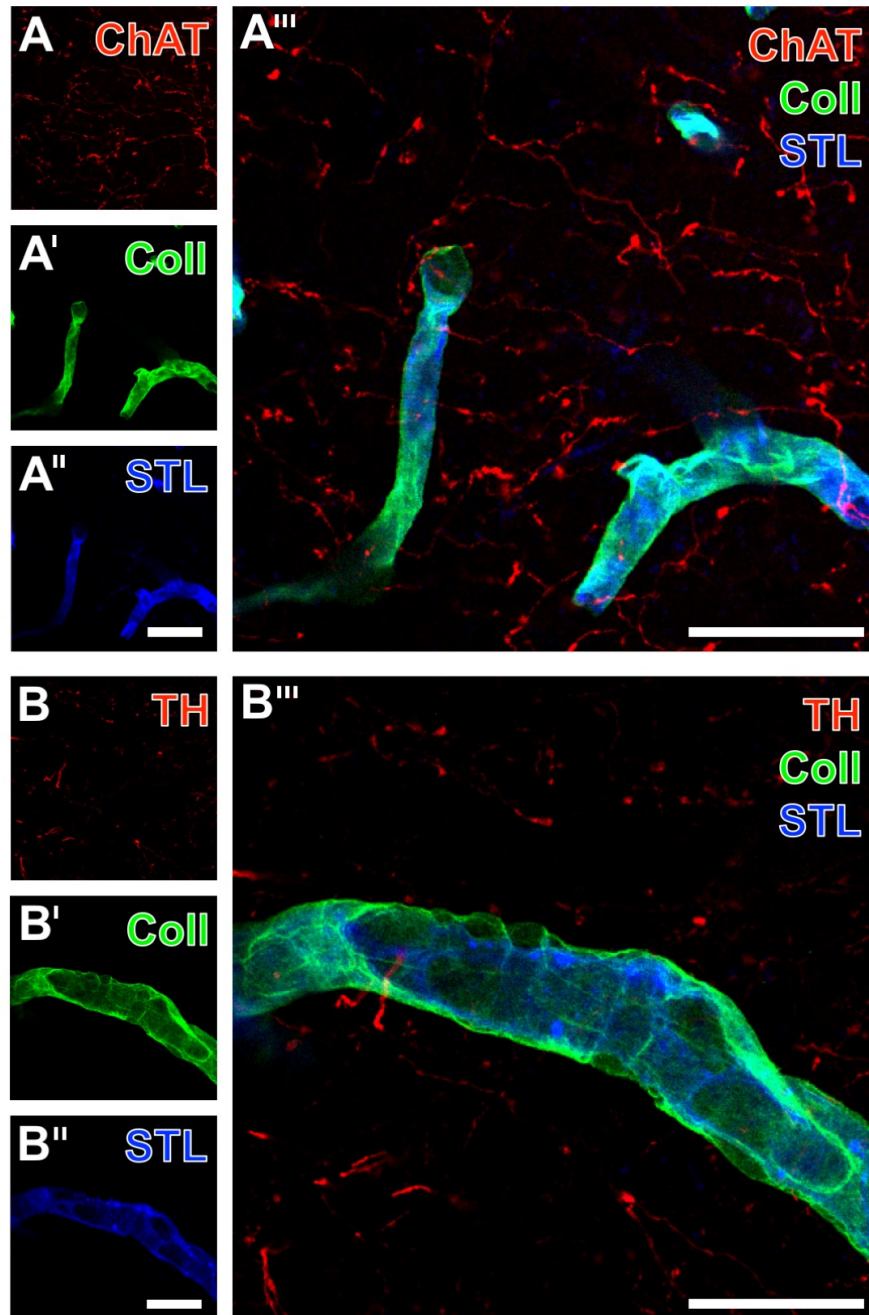
Nach Michalski et al., J Alzheimers Dis, im Druck.



**Abbildung 4.5:** Streudiagramme aller Ergebnisse zur Visualisierung inter-hemisphärischer Veränderungen von *Solanum tuberosum* Lektin ( $\Delta$  STL) und Cholinazetyltransferase ( $\Delta$  ChAT) in verschiedenen Regionen des Gehirns 24 Stunden nach unilateral induzierter fokaler zerebraler Ischämie. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen vaskulären und neuronalen Merkmalen in der direkten Ischämiezone sowie im Neokortex. Das positive Vorzeichen des Koeffizienten zeigt die Veränderungen in gleicher Richtung, d.h. dass ein Rückgang der ChAT-Immunreaktivität mit einem Rückgang der STL-Färbung einhergeht. r: Pearson-Korrelationskoeffizient, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ . Streudiagramme und respektive Analysen mit  $n = 22$  und  $n = 23$  Tieren.

Nach Michalski et al., J Alzheimers Dis, im Druck.





**Abbildung 4.6:** Gefäß-Doppelmarkierung von Kollagen IV-markierten Basalmembranen und umschlossenen STL-markierten Endothelzellen kombiniert mit der Darstellung afferenter Fasern, entweder ChAT (A) oder TH (B) exprimierend. LSM-Bilder vom ischämiebetroffenen Striatum einer jungen 3xTg-Maus in geringerer Vergrößerung (A-A'') und stärker vergrößert (B-B''). Die STL-Markierung (A'', B'') detektiert die gleichen Gefäße wie hochreguliertes Kollagen IV (A', B'). Die Fusionsbilder zeigen den Gefäß-Nervenfasern-Kontakt mit cholinergen bzw. katecholaminergen Fasern (A''', B'''). Im Übersichtsbild mit höherer Vergrößerung (B''') wird besonders deutlich, wie Endothelzellen von Kollagen IV-markierter Basalmembran umhüllt werden. Scale bars: A'' (auch für A, A') = 25  $\mu\text{m}$ , A''' = 25  $\mu\text{m}$ , B'' (auch für B, B') = 25  $\mu\text{m}$ , B''' = 25  $\mu\text{m}$ .

Nach Michalski et al., J Alzheimers Dis, im Druck.

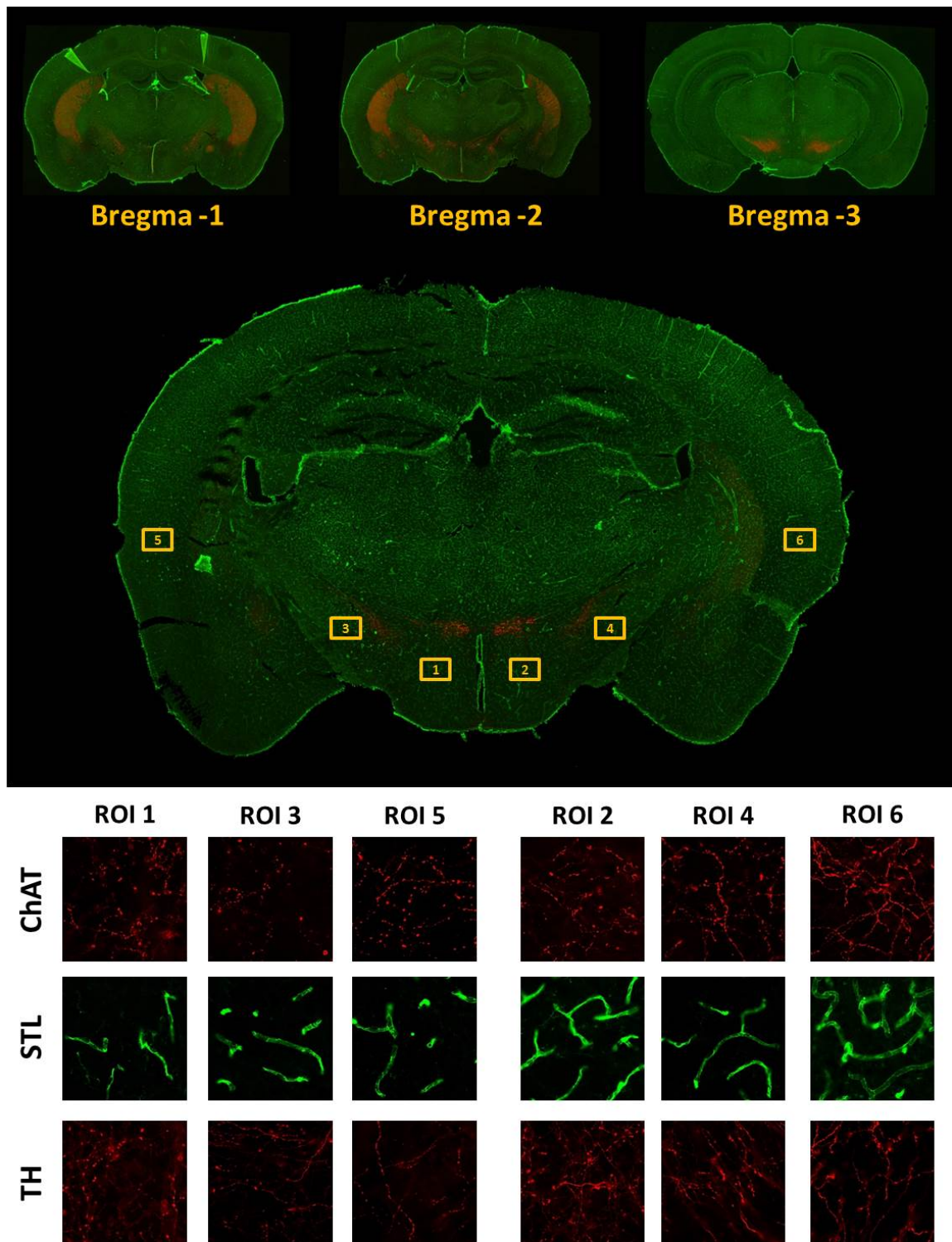
## 4.5 Ischämie-induzierte neurovaskuläre Veränderungen abhängig von Alter und genetischem Hintergrund

Für die semiquantitative Auswertung dienten Serienschnitte mit Doppelmarkierungen von STL mit ChAT oder TH. Um den Effekt der fokalen zerebralen Ischämie auf die Neurovaskuläre Einheit - im Besonderen auf cholinerge und katecholaminerge Nervenfasern - zu evaluieren wurden die verschiedenen Hirnregionen getrennt nach genetischem Hintergrund und Alter der Tiere untersucht. Analysiert wurden jeweils folgende Tiergruppen: 3 Monate WT, 3 Monate 3xTg, 12 Monate WT und 12 Monate 3xTg.

Die Werte der ipsilateralen Seite repräsentieren ein nicht vom Infarkt betroffenes Areal. Um einen Vergleich der Veränderungen auf den Infarktseiten vornehmen zu können, mussten die „Normalwerte“ herausgerechnet werden; so wurde jeweils pro ROI-Paar (ROI1/2, ROI3/4 und ROI5/6) eine Differenz von ipsilateralem minus kontralateralem Wert gebildet (siehe Abb. 4.7). Daraus ergaben sich wie erwartet vorrangig negative Werte, die für eine Schädigung der Parameter stehen. Die Ergebnisse werden nachfolgend mit Diagrammen dargestellt. Im Fall von Intensität und Dichte bedeuten Werte über 0 eine Zunahme des Parameters, während der Wert 0 fehlende Veränderungen anzeigt und Werte kleiner 0 für eine Intensitäts- und Dichteabnahme sprechen. Bei der Diskontinuität kommt es bei Zunahme der Diskontinuität zu Werten unter 0, bei Abnahme der Diskontinuität zu Werten größer 0. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei negativeren Werten, die Diskontinuität zugenommen hat bzw. mehr an Kontinuität verloren wurde.

Da die Immunreaktivität von ChAT und TH infolge des ischämischen Stimulus deutlich abgenommen hatte, wurden weitere Analysen fokussiert auf Alter und genetischen Hintergrund als potentiell beeinflussende Faktoren angeschlossen. Zu diesem Zweck wurden Differenzen der ischämiebetroffenen Hemisphäre und der nicht betroffenen Hemisphäre ( $\Delta$  Intensität,  $\Delta$  Dichte,  $\Delta$  Kontinuität) verglichen zwischen Wildtyp- und 3xTg-Mäusen in den Altersgruppen von jeweils 3 und 12 Monaten (Abb. 4.8).

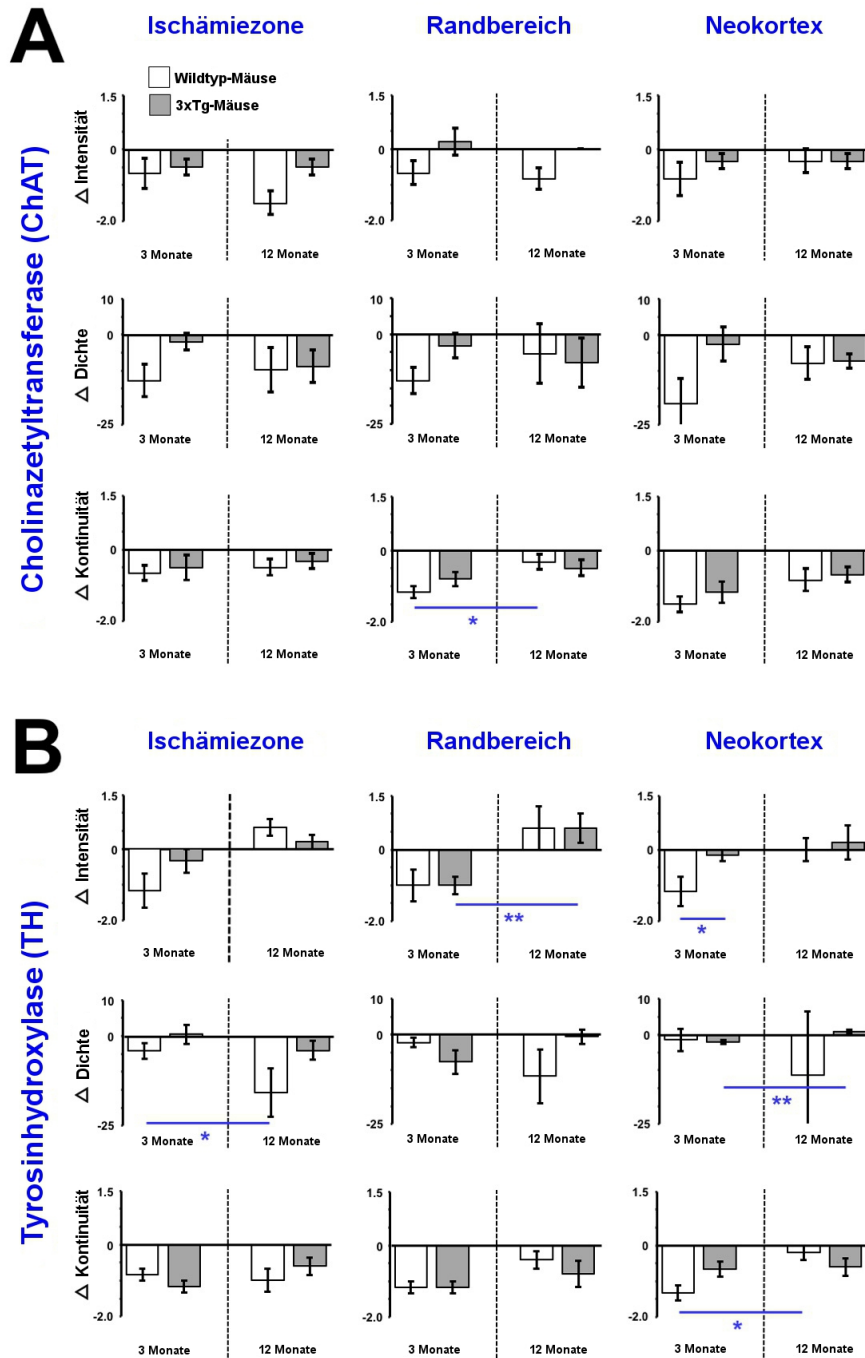
Bei 3 Monate alten Tieren zeigte die ChAT-Immunmarkierung einen eindeutigen Trend zur bereits beschriebenen Abnahme der Färbeintensität und Faserdichte bei Wildtyp-Mäusen im Vergleich mit triple-transgenen Tieren. Dieser Effekt zeigte sich



**Abbildung 4.7:** Übersicht zum Auswerteverfahren. Für die jeweilige Bregmaebene wurden 6 Regions of Interest (ROI 1 bis 6) an entsprechender Stelle festgelegt. Für jede Region wurde je ein Bild cholinergischer (ChAT) und catecholaminerger (TH) Fasern sowie der Gefäße (STL) angefertigt.

in allen 3 Messbereichen: Ischämiezone, Grenzbereich und Neokortex (Abb. 4.8A) jedoch ohne statistische Signifikanz (p-Werte zwischen 0,093 und 0,699; Mann-Whitney *U* Test). Dagegen konnte bei 12 Monate alten Tieren ein deutlicher Unterschied in Bezug auf den genetischen Hintergrund für die Färbeintensität in der Ischämiezone und im Grenzbereich festgestellt werden; eine statistische Signifikanz wurde jedoch knapp verfehlt ( $p = 0,065$  für beide; Mann-Whitney *U* Test). Die Analysen hinsichtlich der Kontinuität ChAT-immunpositiver Fasern lieferten keinen Unterschied beim Vergleich der genetischen Gruppen sowohl bei 3 als auch 12 Monate alten Tieren. Potentielle altersassoziierte Effekte zeigten sich als signifikanter Unterschied der Faserkontinuität im Sinne eines hohen Maßes an Diskontinuität bei Wildtyp-Mäusen beim Vergleich zwischen 3 und 12 Monate alten Tieren, mit Betonung auf Seiten der jüngeren Mäuse ( $p = 0,041$ ; Mann-Whitney *U* Test).

Die Immunmarkierung von TH in Abhängigkeit von Alter und genetischem Hintergrund zeigte ein inhomogeneres Bild im Vergleich zu ChAT-immunpositiven Fasern (Abb. 4.8B). Erwähnenswert ist, dass 3 Monate alte Tiere beim Vergleich zwischen Wildtypen und Alzheimer-veränderten Tieren einen signifikanten Rückgang der TH-Immunreaktivität im Neokortex auf Seiten der nativen Tiere aufwiesen ( $p = 0,041$ , Mann-Whitney *U* Test). Analysen zu altersabhängigen Effekten ergaben einen stärkeren Rückgang der TH-Faserdichte in der Ischämiezone bei 12 Monate alten Tieren im Vergleich zu jüngeren Tieren ( $p = 0,017$ , Mann-Whitney *U* Test). Dagegen war bei 3 Monate alten Tieren eine ausgeprägte Abnahme der TH-Färbeintensität im Grenzbereich sowie der TH-Faserdichte im Neokortex zu sehen (jeweils  $p = 0,009$ , Mann-Whitney *U* Test). Bezüglich der Faserintegrität der TH-immunpositiven Fasern wurde lediglich im Neokortex von Wildtyp-Mäusen ein signifikanter Unterschied festgestellt: In 3 Monate alten Mäusen wurden reduzierte Werte als Indikator für eine höhere Diskontinuität im Vergleich zu älteren Tieren festgestellt ( $p = 0,017$ , Mann-Whitney *U* Test).



**Abbildung 4.8:** Immunfluoreszenz-basierte Quantifizierung inter-hemisphärischer Veränderungen von Cholinazetyltransferase ( $\Delta$  ChAT) und Tyrosinhydroxylase ( $\Delta$  TH) verschiedener Regionen im Gehirn. Gezeigt werden Färbeintensität, Faserdichte und Kontinuität (geordnet von 1 [hoher Grad an Diskontinuität] bis 3 [keine Unterbrechungen der Fasern]) im Bezug auf Alter (3 vs. 12 Monate) und genetischen Hintergrund (Wildtyp vs. 3xTg) einen Tag nach unilateral induzierter fokaler zerebraler Ischämie. Dargestellt sind Mittelwerte als Balken und Standardfehler als aufgesetzte Linien, berechnet mit Mann-Whitney  $U$  Test für statistische Signifikanz. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ . Deskriptive Analysen und statistische Kalkulationen basierend auf  $n = 5 - 6$  Tieren je Gruppe. Nach Michalski et al., J Alzheimers Dis, im Druck.

## 5 Diskussion

Schlaganfälle in komorbiden Alzheimer-Patienten sind seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Allerdings konnten noch nicht alle relevanten Aspekte aufgeklärt werden. Zahlreiche Fragestellungen zur Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen bei der Entstehung des ischämischen Hirnschadens bedürfen weiterer Analysen. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, neuronale Änderungen mit besonderer Betonung des cholinergen Systems in Verbindung mit vaskulären und glialen Veränderungen im Gehirn mit Alzheimer-typischen Modifikationen und in welchem als Komorbidität eine Ischämie induziert wurde, darzustellen. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien, die sich eher mit ischämischen Konsequenzen Alzheimer-typischer Merkmale, wie z.B. dem Vorkommen von Tau-Hyperphosphorylierung beschäftigten, ist die vorliegende Studie auf simultane histopathologische Veränderungen der neurovaskulären Einheit fokussiert. Streng dem Konzept der NVU folgend, zeigt die Studie neue Einblicke der Beziehungen zwischen neuronalen Subpopulationen, des Gefäßsystems und der Gliazellen. Da vaskuläre Faktoren sowohl im Entstehungsmechanismus bei der Alzheimerschen Demenz als auch beim Schlaganfall eine tragende Rolle spielen (del Zoppo 2012; Nation et al. 2011; Nikolakakis and Hamel 2011; Pimentel-Coelho and Rivest 2012; Michalski et al. 2016), untersuchten wir den ischämischen Effekt außer in Wildtyp-Mäusen auch in 3xTg-Mäusen mit neuropathologischen Veränderungen, wie sie auch für die Alzheimersche Erkrankung charakteristisch sind. Um potentielle altersabhängige Effekte als typisches Merkmal der Alzheimerschen Erkrankung zu untersuchen, wurden in die Analysen zwei Altersgruppen eingeschlossen: 3 Monate junge und 12 Monate alte Tiere jeweils als Wildtyp oder mit transgenem Hintergrund. Bei einer großen Vielfalt verschiedener Tiermodelle in der Alzheimerforschung entschieden wir uns für ein triple-transgenes Mausmodell mit altersabhängiger Ablagerung von  $A\beta$  und Tau-Phosphorylierung. Um dem Untersuchungsaufbau gerecht zu werden, d.h. um Alzheimer-typische Veränderungen zusammen mit Ischämiebedingten Bestandteilen der NVU zu untersuchen, wurden verschiedene Fluoreszenzfärbeserien angefertigt. Dabei erfolgte die Visualisierung von Phospho-Tau, Gesamt-

A $\beta$  und terminal verkürztes Pyroglutamyl-A $\beta$ , begleitend von morphologisch veränderten Gefäßen, Astro- und Mikroglia.

Zu Beginn der Diskussion sollen die eingesetzten Versuchstiere und das Studiendesign betrachtet werden. Danach werden angewandte Methoden und mögliche Fehlerquellen diskutiert. Schließlich wird ein Vergleich der ermittelten Ergebnisse mit bereits publizierten Daten vorgenommen.

## 5.1 Versuchstiere

Tiermodelle tragen in großem Maße zur Untersuchung von neuropathologischen Veränderungen, kognitiven Prozessen, Verhaltensausrägungen und deren Zusammenspiel bei. Sie können einen Einblick in die der Krankheit zugrundeliegenden, pathogenen Mechanismen geben um darauf basierend, erfolgreiche Therapiekonzepte für den Menschen zu konzipieren. Limitierender Faktor ist hierbei der aktuelle Wissenstand hinsichtlich der Krankheiten, so dass die Tiermodelle nur spezifische Aspekte statt eines umfassenden Bildes der Erkrankung wiederzugeben vermögen (van der Staay et al. 2009).

Limitationen von Tiermodellen fußen auf der einzigartigen Genetik des Menschen sowie biochemischen und physiologischen Unterschieden im Vergleich mit Nagetieren (Offner 2014). In Bezug auf die Schlaganfallforschung wird in diesem Zusammenhang die eindeutig zu unterscheidende Leukozytenzusammensetzung diskutiert: Beim Menschen sind 50-60% der Leukozyten neutrophil und 15-30% Lymphozyten. Dagegen haben Nagetiere lediglich 15-20% neutrophile Leukozyten, aber 60% Lymphozyten. Die Bedeutung dieser Unterschiede in Bezug auf postischämische Konsequenzen ist nicht geklärt, aber vor allem bezüglich der neuroinflammatorischen Antwort erwähnenswert (Sharp und Jickling 2014).

Die Wahl von Mäusen als Versuchstiere in der experimentellen Schlaganfallforschung kann damit begründet werden, dass eine Vielzahl von pathophysiologischen Gemeinsamkeiten zwischen beiden Säugerspezies besteht (Dirnagl et al. 2014). Nach Gregory et al. (2002) korrespondieren 88% des menschlichen Genoms mit dem der Maus.

Betrachtet man die Auswirkungen der fokalen zerebralen Ischämie, so reagieren Nagetiere nahezu gleich sensitiv wie Menschen. Die intrazerebrale Entwicklung des Infarkt sowie die Ausbildung der Penumbra zeigen zudem eine gleichartige zeitliche und histopathologische Dynamik. Weiterhin ist das Thrombolysezeitfenster nach dem embolischen Geschehen in beiden Spezies nahezu identisch (Sena et al. 2010).

Konsequenterweise ist eine größere Vergleichbarkeit gegeben, wenn der untersuchte Mausstamm hinsichtlich seiner anatomischen Gegebenheiten eine möglichst hohe Übereinstimmung mit dem Menschen hat. Beispielsweise bilden fast alle Säugetiere einen arteriellen Gefäßkreislauf, den *Circulus arteriosus Willisii*, der die Blutversorgung des Gehirns gewährleistet (Edvinsson et al. 1993), aber vor allem im menschlichen Gehirn besteht ein außerordentlicher Variantenreichtum in dessen Anatomie. Daher ist es von großer Bedeutung, wie in der vorliegenden Arbeit einen Mausstamm zu verwenden, der einen *Circulus arteriosus Willisii* besitzt, der dem humanen in seiner Ausprägung nahe kommt.

Es wurden Mäuse beider Geschlechter analysiert, um generalisierte Aussagen treffen zu können und den nach Ischämie beobachteten Schutzeffekt von Östrogenen, die im weiblichen Organismus in höherer Konzentration vorliegen, zu minimieren (Gibson 2013).

Für die Schlaganfallforschung ist ein Zurückgreifen auf Tierversuche unabdingbar. Um eine Vergleichbarkeit der Situation bei Schlaganfallpatienten zu ermöglichen, ist es notwendig, Versuche am lebenden Organismus durchzuführen. Nur dadurch ist gewährleistet, pathophysiologische Mechanismen im komplexen Krankheitsverlauf nachzubilden (Elder et al. 2010). Nagetiere eignen sich auf Grund ihrer einfachen Handhabung in besonderem Maße. Wegen der Ähnlichkeit von Zell- und Organfunktionen bei Säugetieren kann davon ausgegangen werden, dass grundsätzlich eine Übertragung vom Mausmodell auf den Menschen möglich ist. Allerdings weisen Maus und Mensch im Bezug auf die Strukturierung ihres Gehirns wesentliche Unterschiede auf (Offner 2014). Neben dem offensichtlichen Größenunterschied zwischen dem nur wenige Gramm wiegenden Nagerhirn und dem ca. 1000g wiegenden menschlichen Hirn, besitzt der Mensch ein stark gefurchtes gyrenzephalales Gehirn mit vielen Einfaltungen der Großhirnrinde im Gegensatz zu lissenzephalen Gehirnen ohne Furchungen und Gyri bei Nagetieren. Diese Unterschiede kommen jedoch bei rein histologischen Untersuchungen kaum zum Tragen und sind im vorliegenden Fall nicht als nachteilig anzusehen.

Weil in der vorliegenden Studie sowohl weibliche als auch männliche Mäuse untersucht wurden, lässt sich keine genaue Aussage zu geschlechtsspezifischen Unterschieden treffen. Mit einer Endzahl von  $n = 6$  handelt es sich um eine relativ kleine Stichprobenpopulation. Dennoch können die erlangten Ergebnisse auf mögliche Korrelationen hinweisen.

Die auch in der vorliegenden Arbeit versuchte Modellierung der Komorbidität nach



Schlaganfall und Alzheimer-artigen Veränderungen basierte auf einem mehrfach transgen-verändertem Modell (Oddo et al. 2003 a,b). Die Alzheimersche Demenz als ein ätiologisch multifaktoriell verursachtes Geschehen kann allerdings nicht hinreichend durch ein einziges Modell erklärt werden. Die Ausprägung nur weniger histopathologischer Korrelate führt nicht zur Entstehung weiterer Merkmale der Erkrankung; daher ist die Integration mehrerer Transgene in einem Tier sinnvoll. Das vorliegende 3xTg-Mausmodell von Oddo et al. (2003a) vereint zwei wesentliche histopathologische Kennzeichen der Erkrankung. Es gilt als erstes transgenes Modell, das die genetisch bedingte, altersabhängige  $\beta$ -Amyloid- und Taupathologie gemeinsam präsentiert.

Transgene Mäuse erlauben die gezielte Forschung einzelner Aspekte einer Pathologie, unter Einschluss wichtiger pharmakologischer Testungen von therapeutischen Ansätzen am lebenden Organismus, was beim Menschen unter ethischen Gesichtspunkten nicht vertretbar ist (Duyckaerts et al. 2008). Fehlermöglichkeiten können dadurch entstehen, dass transgene Mäuse aufgrund der genetischen Veränderung die neuropathologischen Korrelate der Erkrankung im Übermaß exprimieren. Es werden rasche und möglichst eindeutige Folgen der pathologischen Veränderungen forciert, um in kurzer Zeit, kausale Zusammenhänge untersuchen zu können. Limitierend wirkt zudem, dass nicht die Komplexität der Erkrankung erfasst werden kann, sondern nur wenige neuropathologische Aspekte beleuchtet werden können (Götz et al. 2004; Duyckaerts et al. 2008; Howlett et al. 2009).

Speziell das in dieser Arbeit verwendete transgene Mausmodell zeigt eine große Bandbreite an pathologischen Veränderungen der Alzheimerschen Erkrankung. Es umfasst die Überproduktion von mutierten menschlichen APP und PS1 Varianten, was zur altersabhängigen Ablagerung von parenchymatösen  $A\beta$ -Plaques führt. Als limitierendes Modell einer menschlichen Erkrankung, kann es diese nicht vollständig kopieren und es zeigt keinen deutlichen cholinergen Zellverlust (Götz et al. 2004; Frank et al. 2008; Härtig et al. 2014); zu Forschungszwecken bietet es jedoch eine ausreichende Simulation der Wechselwirkungen verschiedener Korrelate der AD.

### **5.1.1 Die 3xTg-Maus als Modell für Alzheimer-artige Veränderungen**

Transgene Mäuse, die humanes mutiertes APP überexprimieren, sind weit verbreitet in der Grundlagenforschung zur Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung. Da dieses Krankheitsbild jedoch multifaktorielle Ursachen vereint, ist zu klären, in-

wieweit das untersuchte Mausmodell mit dem menschlichen Krankheitsprozess bzw. spezifischen Aspekten der Erkrankung korreliert.

Ebenso wie für den Menschen beschrieben (Gouras et al. 2000), beginnt die  $A\beta$ -Pathologie bei der 3xTg-Maus mit der Akkumulation des intrazellulären Amyloids im Neokortex und im Hippokampus mit anschließender Bildung extrazellulärer Plaques in der hippokampalen Formation (Oddo et al. 2003b). Auch die räumliche Ausprägung der pathologischen Veränderungen im untersuchten Tiermodell und im Menschen ähneln sich. Nach Braak und Braak (1991) erscheinen im Patienten als wesentliche vulnerable Regionen Neokortex, Hippokampus und Amygdala. Jedoch sind die Neuronenverluste sowie die Ausbildung von neurofibrillären Tangles im Tiermodell nicht in vergleichbarem Ausmaß ausgeprägt wie beim Menschen. Ursächlich dafür werden die kürzere Lebensphase der Maus und Unterschiede in der Genexpression, der Vulnerabilität gegenüber der  $\beta$ -Amyloid-Expression und den Eigenschaften des Tau-Proteins angeführt (Kokjohn und Roher 2009; Elder et al. 2010).

## 5.2 Das Fadenmodell als patientennahes Schlaganfallmodell

Die häufigste Schlaganfallform beim Menschen ist die fokale Ischämie, wobei meist die Arteria cerebri media betroffen ist. Es gibt mehrere Möglichkeiten, um eine fokale Ischämie im Mausmodell auszulösen. Als Standard dient der einzige Verschluss der Arteria cerebri media (middle cerebral artery occlusion, MCAO), wobei verschiedene Techniken zur Anwendung kommen (Liu und McCullough, 2011).

Das in der vorliegenden Studie angewandte Fadenmodell zum Verschluss der Arteria cerebri media unterliegt maßgeblich der Erfahrung und Übung des Operateurs. Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten ist eine kontinuierliche Durchführung der Experimente stets durch denselben erfahrenen Operateur anzustreben. Dies konnte in der vorliegenden Studie gewährleistet werden.

Das Fadenmodell zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Läsionen. Vorteilhaft im Vergleich zum thrombembolischen Modell ist die geringe Varianz in der Ausprägung, Größe und Lokalisation der Infarkte (Young et al., 2007). Hierfür mit verantwortlich sind die bestmögliche Abstimmung zwischen Anatomie der Versuchstiere sowie Länge und Dicke des Filaments.

## 5.3 Methoden

### 5.3.1 Histochemie: Vorzüge und Limitationen

Die vorliegende Arbeit basierte auf technisch gelungenen Sätzen von frontalen Serienschnitten des Vorderhirns, wobei jeweils jeder 10. Schnitt einer Serie zugeordnet wurde. Geringfügige Unterschiede der analysierten Schnittebenen zwischen einzelnen Mäusen könnten aus Auswahl der Hirnschnitte für die immunhistochemischen Färbungen, der Selektion von je 3 Schnitten pro Maushirn zur mikroskopischen Analyse sowie der Individualität der Gehirne resultieren. Da der Hauptgegenstand der Studie jedoch in der mikroskopischen Untersuchung der Gefäß-Nerven-Kontakte zu sehen ist, wurde diese Störgröße toleriert.

Die Fluoreszenz-Histochemie erlaubt eine visuelle Darstellung der Zielstrukturen mit deutlicher Differenzierbarkeit zu umliegenden Strukturen. Ein großer Vorteil der Fluoreszenzmarkierungen besteht in der möglichen simultanen Detektion mehrerer Marker und der direkten Visualisierung ihrer Lagebeziehungen, in der vorliegenden Studie z.B. an einem Keyence-Fluoreszenzmikroskop mit dazugehöriger Computersoftware. Jedoch kam es auch hierbei zu Limitationen: Feinste Unterschiede in der Morphologie der cholinergen Komponenten und Diskontinuitäten im Faserverlauf waren einer Analyse mittels Computerprogramm z.B. nicht zugänglich. Hierbei musste auf eine quantitative visuelle Vermessung mittels eines zuvor festgelegten Scores zurückgegriffen werden.

Während der Gewebepreparation und im Färbeprozess kam es teilweise zu Verlust bzw. Beschädigung vulnerabler Gewebe, sodass vor allem aufgrund der teilweise fehlenden ischämischen Zielregion nicht alle Schnitte einer adäquaten Analyse zugeführt werden konnten.

### 5.3.2 Mögliche Analysefehler bei der Semiquantifizierung

Bei der Arbeit mit biologischen Materialien wie in der vorliegenden Studie ist grundsätzlich von einem interindividuellen Variantenreichtum mit erhöhtem Einfluss von Störgrößen zu rechnen. Um diese auf subjektiven Entscheidungen beruhenden Analysefehler zu minimieren, wurden im Vorfeld Rahmenbedingungen festgesetzt, die eine standardisierte Vermessung ermöglichen sollten. Dabei zu beachten sind Einflussfaktoren wie die unterschiedliche genetische Abstammung der Versuchstiere, nicht gleichbleibende Umweltfaktoren sowie die individuelle Reizverarbeitung - einherge-

hend mit verschiedenen Arten von Anpassungsreaktionen. Die Gesamtheit der biologischen Störgrößen ist nur in begrenztem Maße durch Standardisierung auszuschließen. Um mit möglichst geringen Abweichungen zu arbeiten, wurden in dieser Arbeit sowohl junge als auch alte Wildtyptiere verglichen mit altersgleichen triple-transgenen Tieren, die unter gleichen Bedingungen aufgezogen, gehalten und behandelt wurden. Die gemessenen Parameter der verschiedenen Nervenfasern unterliegen allgemeinen Einflussfaktoren auf den Organismus und sind vom aktuellen metabolischen Zustand abhängig.

### **5.3.3 Analyse des cholinergen Systems: Neuropathologische Veränderungen**

Durch die immunhistochemische Markierung der ChAT, des Schlüsselenzyms für die Biosynthese des Neurotransmitters Azetylcholin, lässt sich die Gesamtpopulation cholinergischer Nervenzellen und ihrer Fortsätze visualisieren. Für die Detektion cholinergischer Fasern wurde in dieser Studie ein in der Ziege generierter und anschließend affinitätschromatographisch gereinigter Antikörper gegen ChAT genutzt, der seit langem etabliert ist (Li und Furness 1998; Härtig et al. 2007).

Änderungen der ChAT-Expression resultieren aus verschiedenartigen Störungen. Relevant sind hierbei eine herabgesetzte Konzentration und Synthese des Neurotransmitters Azetylcholin (Davies und Maloney 1976; Whitehouse et al. 1982; Araujo 1988; Mesulam und Geula 1988), eine verminderte ChAT-Aktivität als Transmittersynthetisierendes Enzym (Davies und Maloney 1976; Whitehouse et al. 1982; Bierer 1995) und eine verringerte Konzentration von nikotinischen Azetylcholinrezeptoren, die hauptsächlich präsynaptisch auftreten (Araujo et al. 1988; Aubert et al. 1992).

Die cholinerge Innervation nahezu des gesamten Neokortex, der Amygdala, des Hippokampus und des Bulbus olfactorius erfolgt durch cholinerge Neurone des basalen Vorderhirns (Wenk et al. 1980; Bigl et al. 1982; Mesulam et al. 1983; Mesulam und Geula 1988; Bigl und Arendt 1991). Jahrelange Erfahrungen mit diesem Marker zeichneten diese Nachweismethode für die vollständige Darstellung cholinergischer Fasern als überaus geeignet aus. Da lediglich cholinerge Komponenten detektiert und angefärbt wurden, kam es nicht zu Überlagerungsphänomenen mit anderen neuronalen Fasern, sodass gemessene Strukturen als ausschließlich cholinerg identifiziert werden konnten. Durch diese Selektivität konnten einzelne Fasern morphologisch genau beurteilt werden.

Die Untersuchungen von Alzheimer- und Down-Syndrom-Patienten ergab, dass es bei Erkrankten im basalen Vorderhirn vor allem zu einer Schädigung cholinergischer Projektionsneurone kommt (Yates et al. 1980; Whitehouse et al. 1982; Arendt et al. 1983; 1985; Casanova et al. 1985). Der cholinerge Zellverlust, der primär vom basalen Vorderhirn ausgeht und im weiteren Verlauf auch die kortikalen Bahnen betrifft, scheint mit dem Schweregrad der Beeinträchtigungen zu korrelieren (Perry 1986; Pappas et al. 2000; Mesulam 2004b; Schliebs, 2005; Schliebs und Arendt, 2006). Resultierend daraus entstand die cholinerge Hypothese, die als Hauptursache der Demenz eine Schädigung des cholinergen Systems postuliert (Bartus et al, 1982). Laut dieser Hypothese kann davon ausgegangen werden, dass die in der Studie detektierten Verluste der cholinergen Anteile mit dementiellen Symptomen des Organismus einhergehen. Dabei konnte die Ursache des Zellverlustes noch nicht geklärt werden. Vielfach wird davon ausgegangen, dass ein Zusammenhang zwischen der cholinergen Neurodegeneration und dem Auftreten von  $\beta$ -Amyloid und Tau besteht (Auld et al. 2002; Mesulam 2004b; Kulshreshtha und Piplani 2016). Interessanterweise tritt die cholinerge Degeneration bereits frühzeitig auf, lange bevor es zur Bildung von pathologischen Plaques und Tangles kommt (Selkoe 2016).

### **5.3.4 Darstellung und Analyse des katecholaminergen Systems**

Das striatale katecholaminerge System ist in verschiedenen Schlaganfallmodellen betroffen und war auch Gegenstand semiquantitativer Analysen. Schon vor Einführung von selektiven Antikörpern gegen die Tyrosinhydroxylase und andere Komponenten des katecholaminergen Systems wurde ein besseres Verständnis dieses Transmittersystems erreicht, indem man seine Lokalisation im Gehirn mittels histochemischer Methoden ermittelte. Bereits in den frühen 1960er Jahren, vor der Ära der Immunhistochemie, entwickelten Falck und Hillarp eine Methode, mit der zum ersten Mal neuronale Systeme im Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden konnten (Falck und Torp 1962; Falck et al. 1962). Für nahezu zwei Dekaden dominierte diese Technik, bis sie in den 1980er Jahren durch vielseitigere immunhistochemische Methoden ersetzt wurde. Die ursprüngliche Falck-Hillarp-Methode basiert auf der Exposition von gefriergetrocknetem Gewebe mit Formaldehyddämpfen, so dass Monoamine wie Adrenalin und Noradrenalin in Iso-Chinoline konvertiert werden, die nach entsprechender Anregung ein grün-gelbes Licht emittieren.

Große dopaminerge Zellgruppen befinden sich in ventralen Gebieten des Mesenzephalons, einschließlich der Substantia nigra (A9-Zellgruppe) und des ventralen Tegment-

tums (A10 Zellgruppe; Lindvall und Björklund 1983). Neurone der A9-Population projizieren mit ihren kräftigen Fasern bis zum Striatum, wodurch die nigrostriatale Bahn gebildet wird. Diese Bahn nimmt eine zentrale Rolle in der Steuerung motorischer Aktivitäten ein (Gerfen 1992). Im Striatum als der wichtigsten Komponente der Basalganglien werden exzitatorisch wirkende Informationen aus dem Kortex transformiert, um gegensätzlich einen inhibitorischen Effekt der Basalganglienkerne zu bewirken. Dabei greifen die hypothalamischen, dopaminergen Neurone sowohl in die Entwicklung und Erhaltung der Hypophyse als auch in die Genexpression und den Metabolismus der hypophysären Hormone ein.

Dopamin und andere Katecholamine sind wichtige Neuromodulatoren im ZNS. Daher führen Reduktion oder Dysregulation dieser Wirkstoffe zu vielen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson oder Schizophrenie (Greengard 2001; Carlsson 2006; Iversen and Iversen 2007). Hierbei ist Morbus Parkinson gekennzeichnet durch einen progressiven Abbau der dopaminergen Projektionsneurone, die im somatomotorischen Anteils des Striatums (Nucleus caudatus und Putamen) liegen. Darüber hinaus kommt es zur Neurodegeneration der tegmental befindlichen dopaminergen Neurone, die zum Striatum projizieren (Pars compacta der Substantia nigra oder A9-Gruppe; Alexander 2004). Zusätzlich zu den motorischen Symptomen ist die Parkinsonsche Erkrankung charakterisiert durch emotionale Störungen, wie Depression, Angstzustände und Apathie. Dies wird verursacht durch Einschränkungen in den mesolimbischen und mesokortikalen dopaminergen Leitungsbahnen, die zum ventralen Striatum (Nucleus accumbens), zur Amygdala und zum präfrontalen Kortex ziehen (Blonder und Slevin 2011). Eine Dopamin-Überfunktion im Striatum zeigt sich bei der Schizophrenie assoziiert mit einer exzessiven Dopamin-D2-Rezeptor-Stimulation, zunehmenden D2-Rezeptor-Bindungen im dorsalen Striatum (Laruelle et al. 2003; Howes and Kapur 2009) sowie steigenden D3-Rezeptor-Bindungen im ventralen Striatum (Joyce and Gurevich 1999).

Wie die Abbildung 1.6 zur Katecholaminbiosynthese verdeutlicht, erfolgt eine schrittweise Umwandlung der Aminosäure Tyrosin durch Katalyse spezifischer Enzyme. Seit Längerem gibt es spezifische Antikörper sowohl gegen die Marker TH, AADC, DBH und PNMT (Armstrong et al. 1982; Hökfelt et al. 1977; Hökfelt et al 1984) als auch gegen die Katecholamine L-Dopa, Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin selbst (Geffard et al. 1995; Mons et al. 1991; Steinbusch et al. 1987).

### **5.3.5 Methodische Limitationen**

Das gewählte triple-transgene Mausmodell scheint sehr geeignet und übertragbar, da es die Hauptmerkmale der Alzheimerschen Erkrankung vereinigt (Oddo et al. 2003; Mastrangelo und Bower 2008; Oh et al. 2010). Studien, die andere Tiermodelle verwenden, sollten Screeningmethoden etablieren, um neuronale Subpopulationen und Komponenten der NVU zu untersuchen, damit vorliegende Erkenntnisse entweder bestätigt oder revidiert werden können. In der vorliegenden Studie wurden als neuronale Bestandteile der NVU ChAT- und TH-positive Subpopulationen ausgewählt und somit entscheidende Enzyme der cholinergen und katecholaminergen Leitungsbahnen untersucht. Bei der Vielfalt verschiedener neuronaler Subpopulationen sollten zukünftige Studien das zu untersuchende neuronale Spektrum erweitern, z.B. auf GABAerge (Inter-)Neurone, die eine zentrale Rolle in neostriatalen Kreisläufen spielen (Tepper et al. 2010). Zudem waren vorliegende Analysen auf einen einzelnen Zeitpunkt, 24 Stunden nach dem ischämischen Ereignis, und auf eine permanente zerebrale Ischämie limitiert. Um eine bessere Übertragbarkeit zu erreichen, sollten zukünftige Studien potenzielle Zeit-abhängige Faktoren, die post-ischämische Reaktionen beinhalten (Dirnagl et al. 1999), sowie die Konditionen nach Reperfusion, als Zustand nach bereits erfolgter therapeutischer Intervention, wie Thrombolyse oder mechanischer Rekanalisation, untersuchen (Hacke et al. 2008; Goyal et al. 2016).

## **5.4 Modellierung krankheitsbedingter Veränderungen**

### **5.4.1 Vaskuläre und gliale Veränderungen im Alzheimer-artigen Gehirn**

Durch eine unilateral induzierte, fokale zerebrale Ischämie mit einer Überlebensdauer von 24 Stunden kommt es zur reaktiven Aktivierung von Astrozyten und einer deutlichen Mikroglia-Reaktion, d.h. es folgen morphologische Veränderungen wie eine zerstörte zelluläre Integrität und zahlenmäßig reduzierte Reaktionen der Astrozyten ebenso wie geschwollene Zellkörper mit weniger ramifizierter Mikroglia. Diese Beobachtungen stimmen überein mit bereits beschriebenen zellulären Veränderungen sowohl für die Alzheimersche Erkrankung selbst (Mastrangelo, Bowers 2008; Rodriguez-Arellano et al. 2016) als auch für eine folgende Ischämie (Hawkes et al.

2013). Im Gegensatz zu unserer vorangegangenen Arbeit (Hawkes et al. 2013) zeigte STL als Gefäßmarker aktuell keinen statistisch signifikanten Unterschied im interhemisphärischen Vergleich der betrachteten ROIs. Die hier präsentierten Daten demonstrieren deutliche morphologische Veränderungen einzelner Gefäße im Sinne von ausgedünnten Strukturen in der Ischämie-betroffenen Region, in enger Nachbarschaft zu neuronalen Komponenten, der hier untersuchten NVU.

Mutmaßlich dem Umstand geschuldet, dass die fokale zerebrale Ischämie Folge eines akuten Gefäßverschlusses ist, wurden in der Schlaganfallforschung Veränderungen der Gefäßmorphologie und -funktionalität bereits intensiv untersucht. Frühzeitig wurden hierbei Versuche der Wiedereröffnung und Revaskularisierung unternommen (Dirnagl et al. 1999; Dirnagl 2012; Hacke et al. 2008; Goyal et al. 2016). Bei Betrachtung der Altersabhängigkeit, z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen, wurde der Begriff NVU erstmalig verwendet, basierend auf der Erkenntnis, dass Merkmale des alternden Gehirns, wie das Vorkommen von  $A\beta$ , und langfristige Konsequenzen kardiovaskulärer Risikofaktoren (z.B. Diabetes mellitus oder Hypertonie) die Gefäßstruktur und zugehörige Gliazellen nachhaltig beeinflussen (del Zoppo 2012; Koizumi et al. 2016; Zlokovíc 2008). Unter Anwendung von Echtzeit-Messungen *in vivo* konnte im Mausmodell mit bilateraler Stenose der A. carotis und daraus folgender chronischer Hypoperfusion eine signifikante Verringerung des Blutflusses in den tiefen kortikalen Arterien sowie eine verringerte Leukozytenadhäsion in den Pialgefäßen nachgewiesen werden (Yata et al. 2014). Des Weiteren zeigte sich in einer Studie mit Einschluss von 19 Patienten mit zerebraler Amyloidangiopathie eine Beeinträchtigung der BHS-Integrität; gemessen mit MR-Bildgebung und Serumspiegeln von Tight-Junction-Proteinen und MMP (Hartz et al. 2012).

Bei mehr auf die Alzheimersche Erkrankung fokussierten Arbeiten zeigten sich sowohl in Tierexperimenten als auch in humanen Studien Veränderungen des Gefäßsystems assoziiert mit BHS-Ausfall. Daraus ließ sich die Hypothese ableiten, dass sich in jedem Fall einige Alzheimer-spezifische pathophysiologische Befunde auf Veränderungen der Gefäßintegrität zurückführen lassen (Nikolakakis und Hamel 2011; Goldwasser et al. 2016). Eine aktuelle Hypothese zur Alzheimerschen Erkrankung geht einen Schritt weiter und diskutiert eine Drainagestörung von perivaskulärem  $A\beta$  als ausschlaggebenden Faktor des Krankheitsfortschreitens (Bakker et al. 2016; Morris et al. 2016). Auch diese Hypothese bietet noch Diskussionsbedarf, zeigt jedoch den aufkeimenden Gedanken, dass ein bidirektionaler kausaler Zusammenhang zwischen neuronalen Elementen der Alzheimerschen Erkrankung und Veränderungen des Gefäßsystems, wie



z.B. der BHS, besteht.

Morphologische Veränderungen der Astrozyten im Alzheimer-typischen Gehirn wurden bereits in verschiedenen experimentellen Studien beschrieben. Eine reaktive Astrogliose als Antwort auf die Alzheimer-typische Pathophysiologie ist weithin akzeptiert (Rodrigues-Arrelano et al. 2016; Pekny und Pekna 2016). Dieser Ansatz gründet sich darauf, dass astrogliale Veränderungen wie auch die Alzheimer-typische Pathologie altersabhängig auftreten (Oddo et al. 2003). Gegen die traditionellen Perspektiven sprechen neueste Studien (Pekny und Pekna 2016; Kamat et al. 2014), die allerdings die Theorie unterstützen, dass diese krankheitsabhängigen neuropathologischen Veränderungen bei Alzheimerpatienten eher eine Folge von astroglialer Fehlfunktionen sind.

Mikroglia als überwiegend immunologisch aktive Zellen wurden sowohl im gesunden Gehirn als auch bei diversen neurodegenerativen und ischämisch veränderten Gehirnen analysiert (Hanisch und Kettenmann 2007). Auf dem Gebiet der Alzheimerforschung wurden frühzeitig morphologische Veränderungen der Mikroglia beschrieben (Streit et al. 2014), wobei ein kausaler Zusammenhang als einseitig im Sinne von zellulärer Aktivierung durch charakteristische Ablagerungen von  $A\beta$  im Alzheimer-Gehirn angenommen wurde (Itagaki et al. 1989). In einer aktuellen Studie am Mausmodell für Alzheimer und Schlaganfall wurde eine Mikroglia-Subpopulation identifiziert, die muskarinerge Azetylcholinrezeptoren aufweist (Pannell et al. 2016). Die Relevanz dieser Erkenntnis zeigt sich darin, dass Spiegel des entsprechenden Schlüsselenzyms, der Cholinazetyltransferase, mit dem Grad der kognitiven Beeinträchtigung des menschlichen Gehirns korrelieren (Pappas et al. 2000). Da das cholinerge System charakterisiert ist als weites Netzwerk, das zwischen kortikalen und subkortikalen Regionen kommuniziert, wurden im Alzheimer-Modell gefundene Veränderungen in kausalem Zusammenhang gebracht mit anderen Alzheimer-typischen Merkmalen wie Tau-Phosphorylierung und Vorkommen von  $A\beta$ . Zusammengefasst zeigen die Befunde aus den letzten beiden Dekaden, dass Veränderungen der Gefäßstrukturen, der Astro- und Mikroglia im Zusammenspiel mit klinischen Befunden und histopathologischen Kennzeichen der Alzheimerschen Erkrankung einen hohen Stellenwert in der Forschung erlangten; begleitend fand ein Wandel der bisherigen traditionellen, einseitigen Sicht hin zu kausalen Zusammenhängen als bidirektionales Modell mit Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen innerhalb der NVU statt (Iadecola 2004; Nelson et al. 2016; Michalski et al. 2016). Aus den beschriebenen multiplen Wechselwirkungen in der NVU mit darausfolgenden Konsequenzen auf die Krank-

heitsprogression oder zumindest die Beeinflussung der Alzheimerschen Erkrankung ergeben sich weitere Startpunkte zur Etablierung neuer Behandlungsstrategien (Zlokovic 2008).

### 5.4.2 Neurovaskuläre Veränderungen durch Ischämie

Cholinerge neuronale Strukturen wie Nervenfasern und Zellkörper wurden in enger Nachbarschaft zu Gefäßen nachgewiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Strukturen einen wesentlichen Teil der neurovaskulären Einheit im Alzheimer-Gehirn ausmachen. Qualitative und erweiterte quantitative Analysen ergaben, dass ChAT-immunpositive Strukturen einen signifikanten Rückgang der Färbeintensität und Faserdichte nach Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie aufweisen. Ein Rückgang der beiden Färbeparameter zeigte sich zudem im ischämischen Randbereich sowie im ipsilateralen Neokortex, trotzdem letzterer weit entfernt ist von der Region, die direkt vom Verschluss der Arteria cerebri media betroffen ist. Mit der ChAT-Immunreaktivität wurde eine robuste Technik zur Visualisierung cholinergischer Neurone angewandt.

Aus den erlangten Ergebnissen lassen sich zwei wesentliche Auswirkungen schlussfolgern: Zum Ersten bestärken die nachgewiesenen weiträumigen Auswirkungen auf Regionen jenseits des Striatums als primär von der Ischämie affiziertes Areal die bereits bestehenden Daten zu einem weitreichenden Netzwerk cholinergischer Fasern, die bis hin zu neokortikalen und subkortikalen Regionen reichen (Schliebs und Arendt 2006; Coyle et al. 1983). Da zum Zweiten die durchgeführten Analysen in Bezug auf die kontralaterale, nicht betroffene Hemisphäre korrigiert wurden, könnte die gefundene Verringerung der ChAT-Immunreaktivität als Resultat auf den ischämischen Stimulus gesehen werden. In Zusammenschau mit unseren zuvor erhaltenen Befunden, dass es zu Gefäßveränderungen im Sinne von Kollagen-IV-Hochregulierung 24 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie kommt, illustrieren die vorgelegten Ergebnisse die vielfältigen Reaktionen der NVU trotz einer relativ kurzen Dauer von einem Tag Überlebenszeit nach ischämischem Stimulus. Damit ist es wahrscheinlich, dass es bei einer längerfristigen Betrachtungszeit zu einer gesteigerten Detektion Alzheimer-typischer histologischer Merkmale kommt, vor allem, da frühere Studien bereits bei einer Überlebenszeit von 3 Monaten nach zerebraler Ischämie veränderte Spiegel von Tau feststellen konnten (Koike et al. 2011; Majd et al. 2016).

Obwohl in der vorliegenden Studie kognitive Konsequenzen nicht untersucht wurden, sind Auswirkungen wahrscheinlich. Zwei kürzlich veröffentlichte Studien (Keeley et

al. 2015; Amtul et al. 2014), die kombiniert die A $\beta$ -Toxizität (nach intraventrikulärer Peptidinfusion) und Endothelin-1-induzierte Ischämie untersucht hatten, detektierten eine beeinträchtigte Gedächtnisfunktion, wenngleich die ChAT-Immunfärbung im Striatum nur einen dezenten Rückgang zeigte. Vergleichbare Datensätze wurden auch von Kemppainen et al. veröffentlicht: Es kam zu einer deutlichen Verschlechterung der räumlichen Gedächtnisfunktion während der ersten 5 Tage nach transienter globaler zerebraler Ischämie im Mausmodell mit Alzheimer-typischem genetischen Hintergrund (Kemppainen et al. 2014).

Die vorliegende Studie belegt die zentrale Beeinträchtigung des katecholaminergen Systems in der ischämie-betroffenen NVU im Alzheimer-Gehirn dahingehend, dass TH-positive Strukturen faserähnliche Ansammlungen in enger Nachbarschaft zu Gefäßen in ischämie-betroffenen Regionen bilden. Die durchgeführten quantitativen Analysen zeigten einen signifikanten Rückgang der Faserdichte im ipsilateralen Striatum und Grenzbereich. Bei Messungen der TH-Immunreaktivität konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen der ischämie-betroffenen und nicht-ischämisch-beeinflussten Hemisphäre festgestellt werden. Dieses Ergebnis lässt regionale Limitationen der ischämischen Leitungsbahnen des katecholaminergen Systems vermuten, zumindest wenn diese von TH verarbeitet werden.

Um Eigenschaften der ChAT-positiven neuronalen Strukturen in Verbindung mit dem Gefäßsystem zu untersuchen, wurden Streudiagramme für interhemisphärische Differenzen angefertigt, wodurch die Beziehung zwischen neuronalen und vaskulären Komponenten als berechnete Korrelation visualisiert wurde. Hier zeigten sich statistisch signifikante Veränderungen in Bezug auf die Färbeintensität innerhalb des direkt von der Ischämie betroffenen Striatum sowie des ipsilateralen Neokortex. Das positive Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten zeigt an, dass die Ischämie-bedingte Verringerung der ChAT-Immunreaktivität gleichsinnig eine Verminderung der STL-Markierung bewirkt, jedoch mit größerer Streuung. Trotzdem ist eine kausale Beziehung deutlich, da sowohl AD-spezifische als auch altersabhängige Eigenschaften die Gefäßreaktionen auf den ischämischen Stimulus erklären könnten. Die Altersabhängigkeit betreffend zeigte eine Studie mit nicht-transgenen Mäusen verschiedener Altersstufen mit chronisch zerebraler Hypoperfusion einen signifikanten Rückgang der zerebrovaskulären Reaktivität und Remodellierung in 18 Monate alten Tieren verglichen mit 4 bis 6 Wochen und 12 Wochen alten Mäusen (Hecht et al. 2012). Aus diesen Daten geht hervor, dass Alter der ausschlaggebende Faktor für die erhöhte Verletzlichkeit der Gefäßstrukturen gegenüber Ischämieereignissen ist. Auch da in den letzten

Dekaden häufig bidirektionale kausale Zusammenhänge zwischen ischämischen Ereignissen und histopathologischen Korrelaten der Alzheimerschen Erkrankung intensiv diskutiert wurden (Kalari 2000), können verschiedene Gründe für morphologische und funktionelle Veränderungen der Gefäßstrukturen im Alzheimer-Gehirn angenommen werden.

Um altersabhängige Effekte zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie die Analysen erweitert auf Wildtyp- und 3xTg-Mäuse im Alter von jeweils 3 oder 12 Monaten. In allen analysierten Gebieten zeigte sich ein deutlicher Trend zu einer schwerwiegenden Beeinflussung der ChAT-Immunreaktivität durch Ischämie bei jüngeren Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu 3xTg-Mäusen. Bei 12 Monate alten Tieren konnte dieser Trend auch beobachtet werden, jedoch beschränkt auf das ipsilaterale Striatum und den Grenzbereich. Erwähnenswert ist auch der signifikante Unterschied hinsichtlich der Kontinuität der CHAT-positiven Fasern im Infarkt-Grenzbereich im Altersvergleich, wobei 3 Monate alte WT-Mäuse deutlich Fasern mit höhergradiger Diskontinuität präsentierten. Ein ebensolcher Effekt wurde auch bei der Kontinuität der TH-positiven Fasern im Neokortex beobachtet, besonders ausgeprägt in jüngeren WT-Tieren. Die TH-Immunreaktivität ergab signifikante Unterschiede zwischen den genetischen Tiergruppen im Neokortex, da Wildtyp-Mäuse hier einen deutlicheren Rückgang der Färbintensität im Vergleich zu den genetisch veränderten Tieren zeigten. Die beobachteten ungleichmäßigen Veränderungen der Intensität und Dichte der TH-Markierung könnten zusammenhängen mit dem Erscheinungsbild der TH-Markierung: Hauptsächlich wurden faserähnliche Strukturen beobachtet, die teilweise punktförmige Elemente enthielten.

Weil in unserer vorangegangenen Arbeit zu vaskulären Veränderungen nach fokaler zerebraler Ischämie eine Alters- und Phänotyp-abhängige Reaktion der Kollagen-IV-Fasern als Teil des vaskulären Komplexes festgestellt wurde (Hawkes et al. 2013), scheint es wahrscheinlich, dass mehrere Komponenten der NVU altersabhängige Reaktionen auf ischämische Stimuli präsentieren. Diese Reaktionen scheinen sowohl unter primär ischämischen Konditionen (del Zoppo 2012) als auch unter typischen altersabhängigen Merkmalen der Alzheimerschen Erkrankung auf die Komponenten der NVU zuzutreffen (Iadecola 2004; Schliebs und Arendt 2006).

## 5.5 Diagnose und Therapie der Alzheimerschen Erkrankung

Die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung war lange auf histologische Analysen des Hirngewebes *post mortem* beschränkt. In den vergangenen Jahren konnte die Diagnosestellung zudem erheblich verbessert werden, indem in Liquormessungen Tau- und A $\beta$ -Spezies detektiert wurden (Clarke et al. 2015; Chiarini et al. 2017).

Die Grundlagenforschung am Tiermodell erlaubt es zunehmend, am lebenden Organismus die Pathogenese mittels histopathologischer Korrelate zu entschlüsseln. Das Verständnis der Mechanismen auf molekularer Ebene ist äußerst relevant, um eine verbesserte Diagnostik sowie Ansätze der Pharmakotherapie zu erreichen. Außerdem erlauben neue PET-Tracer, die u.a. an Tau oder  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate binden, in Kombination mit Magnetresonanz-Techniken, wie Diffusions-Tensor-Bildgebung (DTI), rs-fMRI (resting state functional MRI) und Arterial Spin Labeling, eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten um verschiedene Demenzformen oder andere neurodegenerative Erkrankungen frühzeitig zu detektieren (Barthel et al. 2015).

Unter den hier präsentierten Ischämie-induzierten Veränderungen sind der signifikante Rückgang der ChAT-Immunreaktivität zusammen mit den Veränderungen der vaskulären und glialen Komponenten der NVU am bedeutsamsten für therapeutische Überlegungen. Hervorzuheben ist, dass die traditionelle Sicht der cholinergen Dysfunktion als ausschließliche Ursache für kognitiven Verfall abgelöst wurde von einer komplexeren Sichtweise im Sinne eines bidirektionalen kausalen Zusammenhangs mit Berücksichtigung von A $\beta$ -Ablagerung und Tau-Phosphorylierung (Auld et al. 2002; Mesulam 2004; Schliebs 2005). Diese Sicht wird durch experimentelle Daten unterstützt: Der durch Immunläsion induzierte Rückgang cholinergischer Projektionsneurone im basalen Vorderhirn der Maus kann Alzheimer-typische Merkmale induzieren, wie z.B. die Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden (Härtig et al. 2014). Zur Analyse vermuteter Auswirkungen des cholinergen Systems auf den Verlauf der Alzheimerschen Erkrankung haben Ahmad et al. ein Rattenmodell mit transienter fokaler zerebraler Ischämie entwickelt, das cholinerge Dysfunktionen als Folge Ischämie-bedingter Reduzierung von ChAT im Striatum verursacht (Ahmad et al. 2012). Experimentelle Behandlung mit Edaravon als Fänger freier Radikale konnte die Folge der ChAT-Verminderung dämpfen und zudem gleichzeitig das neuronale Überleben steigern. Zur Bestätigung dieser Theorie zeigte eine aktuelle Studie von Jiao et al., dass eine experimentelle Behandlung mit Edaravon bei Mäusen mit Alzheimer-Genetik zu einer Reduzierung

des  $A\beta$ -Vorkommens und anderer Hauptmerkmale der Alzheimerschen Erkrankung geführt hat (Jiao et al. 2015). Zudem scheinen diese Daten sehr vielversprechend, um in nachfolgenden Schritten klinische Studien folgen zu lassen.

Aktuell ist keine kausale Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung möglich. Primäre Ziele der Pharmakotherapie sind die Symptomlinderung sowie die Behandlung möglicher Begleiterkrankungen. Da die epidemiologisch identifizierten allgemeinen Risikofaktoren für Schlaganfall und Alzheimersche Demenz, wie z.B. arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus, einen bekannten nachteiligen Effekt für das Gefäßsystem aufweisen, werden aktuell für die Akutbehandlung der Alzheimerschen Erkrankung Medikamente eingesetzt, die normalerweise bei kardiovaskulären Erkrankungen Verwendung finden (Hamel et al. 2016). Dieses Vorgehen wird bestärkt durch eine aktuelle Studie, in der transgene Mäuse mit Alzheimer-typischen genetischen Veränderungen Trinkwasser mit  $N\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid versetzt bekamen, woraus eine signifikante Steigerung des arteriellen Blutdruck resultierte und somit eine chronische Hypertonie initiiert wurde (Kruger et al. 2015). Hervorhebenswert zu dieser Studie ist, dass die chronische Hypertonie zudem eine mikrovaskuläre Ablagerung von  $A\beta$  begleitet von beschleunigtem kognitiven Abbau und verminderter BHS-Integrität sowie Gefäßentzündungen initiiert. Im Gegensatz dazu kam es bei der experimentellen Behandlung mit Telmisartan, einem Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, zu einem verminderten Vorkommen von Tau und  $A\beta$  nach Langzeitgabe in spontan hypertensiven Ratten (Kurata et al. 2014). Obgleich der Gebrauch von Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten eine vielversprechende Strategie gegen die Hauptmerkmale der Alzheimerschen Erkrankung darstellen könnte (Saavedra 2016), müssen, bevor eine Empfehlung ausgesprochen wird, fehlende klinische Studien initiiert werden. Für die Verhinderung eines fortschreitenden Krankheitsverlaufs durch therapeutische Maßnahmen gibt es keine Evidenz. Daraus resultierend ergibt sich, dass die heutige Diagnostik mehr dem Erkennen behandelbarer Begleiterkrankungen dient.

Viele Studien beschäftigten sich mit der Entwicklung neuer, dringend erforderlicher Medikamente für Alzheimer-Patienten. Dazu gehören Wirkstoffe, die Amyloidablagerungen sowie -oligomere im Gehirn gar nicht erst entstehen lassen bzw. diese abbauen (Kulshreshtha und Piplani 2016). Ein Ansatz zeigte sich in der Immuntherapie mit spezifischen Antikörpern gegen niedermolekulare Amyloidformen. Erst durch Nutzung transgener Mausmodelle ist die Nutzung und präklinische Überprüfung der aktiven und passiven  $A\beta$ -Immunisierung möglich geworden (Schenk et al. 1999). Im Tier-

versuch konnte ein Glia-vermittelter Rückgang der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen gezeigt werden (Morgan 2006). Die klinische Erprobung scheiterte jedoch wegen erheblicher Nebenwirkungen.

Großes Behandlungspotential scheint das cholinerge System zu bergen. Vielfältige Wechselwirkungen mit dem Amyloidstoffwechsel bieten einen neuen Ansatz zur Entwicklung weiterer Pharmaka. AChE-Inhibitoren sind bereits im therapeutischen Konzept für die Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung verankert und als medikamentöse Erstlinientherapie bei milden bis moderaten Formen der Alzheimerschen Erkrankung anzusehen. Hierbei zu nennen sind z.B. Donezipil und Rivastigmin, die sich auszeichnen durch ein geringes Nebenwirkungsprofil, eine verlängerte Halbwertszeit und eine gute Wirksamkeit (Kulshreshtha und Piplani 2016). Auch Memantin, als nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist mit neuroprotektiven Eigenschaften, wird zur Therapie genutzt. In transgenen Mäusen konnte dabei ein großer Benefit mit deutlichem Rückgang der kognitiven Einschränkungen erzielt werden. Leider ließ sich dieses Ergebnis in klinischen Studien nicht bestätigen; es zeigte sich lediglich eine geringe Effektivität bei Patienten in moderaten bis schweren Alzheimer-Stadien (Devi und Ohno 2016).

Ein vielversprechender Ansatz zur Reduzierung der  $\beta$ -Amyloid-Belastung ist die A $\beta$ -Immuntherapie. Hierbei wird synthetisiertes  $\beta$ -Amyloid-Peptid, teilweise auch in fragmentierter Form, eingesetzt, um B-Zellen zur Antikörperproduktion zu stimulieren, mit der Konsequenz, dass Amyloid aus dem Hirn nach peripher abgesondert wird (Güell-Bosch et al. 2016). Beispielhaft hierfür kann die Therapie mit Antikörpern gegen Pyroglytamyloxy- $\beta$ -Amyloid- $\beta$  angeführt werden. Eine Studie von Frost et al. (2015) zeigte beizeitigem Einsatz der Immuntherapie eine effektive Verringerung der  $\beta$ -Amyloid-Belastung mit gleichzeitiger Prävention des kognitiven Defizits (Frost et al. 2015). Auch die Immunblockade von Zelltod-Proteinen zeigte eine geringe zerebrale  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung mit verbesserter kognitiver Funktion im Alzheimer-Mausmodell. Dieser Effekt konnte sogar im auch hier verwendeten APP/PS1-Mausmodell mit einer reduzierten  $\beta$ -Amyloid-Belastung im Hippokampus reproduziert werden (Crunkhorn 2016).

Ein weiterer interessanter Behandlungsmodus ist die direkte Modulation der muskarinergen ACh-Rezeptoren (mAChR), durch die eine Reduzierung der Amyloidpathologie erreicht werden soll. AF267B als neuartige M1-selektive Substanz, wurde bereits erfolgreich am 3xTg-Mausmodell getestet (Caccamo et al. 2006). Trotz intensiver Forschung und verschiedener Strategien muss erwähnt werden, dass viele Phase

2-Studien mit einem positiven Outcome in Phase 3 nicht erfolgreich sind, da sie an relevanten Nebenwirkungen, fehlender Effizienz oder beidem scheitern (Godyn et al. 2016). Hierunter fällt z.B. die Phase 3-Studie für Bapineuzumab als monoklonalen Antikörper, in der kein signifikanter Unterschied der Wirksamkeit im Vergleich mit einem Placebo erzielt werden konnte (Vandenberghe et al. 2016).

Als ein zukünftiger, noch nicht etablierter Ansatz in der Alzheimerforschung, sollten Substanzen zur Zellstabilisierung oder zumindest zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität in experimentellen Studien untersucht werden. Die zugrundeliegende Hypothese, dass stabilisierende Effekte innerhalb der NVU, wie ausbalancierte Interaktionen zwischen Neuronen, Gefäßen und glialen Strukturen, die pathophysiologischen Charakteristika auf Zellebene vermindern oder mildern, wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bekräftigt.



# 6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

## **Neurovaskuläre Veränderungen nach fokaler zerebraler Ischämie in Mäusen mit Alzheimer-artigen Merkmalen**

- eingereicht von** Sarah Hofmann  
geboren am 27. Oktober 1990 in Leipzig
- Betreuer** Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Härtig  
PD Dr. med. Dominik Michalski
- angefertigt am** Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,  
Universität Leipzig  
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Leipzig
- eingereicht** August 2017

Alzheimer-Demenz als häufigste Demenzform wird vorrangig als eigenständige neurodegenerative Erkrankung gesehen, teilt jedoch mit dem akuten Schlaganfall einige Risikofaktoren. Das Alter scheint dabei der zentrale Faktor zu sein, der die Überlappung beider Erkrankungen erklärt, da sowohl kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes als auch die Häufigkeit der Alzheimerschen Erkrankung und der zerebralen Ischämie mit steigender Lebenszeit zunehmen. Das steigende Interesse an der genauen Aufklärung der Pathomechanis-

men beider Erkrankungen, kann mit dem demografischen Wandel begründet werden, aus dem die erhebliche absolute Zunahme beider Erkrankungen resultiert und ein enormer volkswirtschaftlicher Kostenaufwand erwächst.

Experimentelle Studien sowie klinische Beobachtungen lassen vermuten, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen der Alzheimerschen Erkrankung und dem Schlaganfall gibt. Es wurde gezeigt, dass Patienten mit einer zerebralen Ischämie in der Anamnese ein erhöhtes Risiko haben an der Alzheimerschen Demenz zu erkranken. Zudem wurde nachgewiesen, dass chronische Hypertonie und experimentelle Schlaganfall-Induktion Alzheimer-artige Veränderungen verursachen, wie z.B. höhere Konzentration von APP und Tau-Phosphorylierung. Gleichsinnig dazu haben Alzheimer-Patienten zum einen ein erhöhtes Risiko für ein ischämisches Ereignis, zum anderen ist das Auftreten eines Schlaganfalls bei Alzheimer-Patienten mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. Es wurde postuliert, dass  $\beta$ -Amyloid und Ischämie bei gemeinsamem Auftreten schlechtere Konsequenzen hervorrufen, als wenn diese Faktoren einzeln vorkommen.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass ischämische Ereignisse, insbesondere mildere Formen, in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an  $\beta$ -Amyloid größere Infarkt volumina, eine fulminantere Entzündungsreaktion und einen schwereren Gedächtnisverlust verursachen im Vergleich zum alleinigen Auftreten von Ischämie oder  $\beta$ -Amyloid. Die offensichtliche wechselseitige Beeinflussung der pathologischen Veränderungen erschwert die Konzipierung erfolgreicher Behandlungsstrategien. Daher wandten sich verschiedene Forschungsgruppen ab von den Angriffspunkten an typischen Merkmalen der Alzheimerschen Erkrankung (wie  $\beta$ -Amyloid, Tau-Hyperphosphorylierung und cholinerge Dysfunktion) hin zu einem komplexeren Denkansatz mit Berücksichtigung von Neuronen in Assoziation mit Gefäßstrukturen sowie Astro- und Mikroglia, zusammengefasst als neurovaskuläre Einheit (NVU). Das Verstehen der komplexen neurovaskulären Pathologie im Alzheimer-Ischämie-Kontext sollte zur Entwicklung neuerer, spezifischer Behandlungsstrategien führen.

Die vorliegende Studie fokussierte dabei auf cholinerge, Cholinazetyltransferase (ChAT)-immunpositive, und katecholaminerge, Tyrosinhydroxylase (TH)-immunpositive, Nervenfasern in Assoziation mit endothelialen Gefäßstrukturen, um die NVU im Alzheimer-Gehirn mit begleitendem Schlaganfall zu untersuchen. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse der ChAT als dem Enzym, dessen Aktivitätsverlust in Zusammenhang mit der altersabhängigen Degeneration von cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn steht. Die Degeneration des cholinergen Systems ist

nachweislich involviert in die Progression der Alzheimerschen Erkrankung sowie mitverantwortlich für einen kognitiven Funktionsverlust, bedingt durch A $\beta$ -Vorkommen und Tau-Phosphorylierung.

Für die vorliegende Studie wurde in Wildtyp-Mäusen und triple-transgenen (3xTg) Mäusen verschiedener Altersgruppen (3 und 12 Monate) eine unilaterale fokale zerebrale Ischämie induziert. Die 3xTg-Mäuse vereinigen zwei menschliche Transgene (Amyloid-Präkursorprotein und Tau) und sind homozygot für das Knock-in-Konstrukt Präsenilin. Zusätzlich wurden drei 2 Jahre alte 3xTg-Mäuse untersucht um altersabhängige Alzheimer-artige Merkmale nachzuweisen.

Histochemische Analysen dienten zum Vergleich der neuronalen und vaskulären Komponenten der NVU sowie der Alzheimer-spezifischen Merkmale. Fluoreszenzmarkierungen bestätigten die Existenz Alzheimer-typischer Charakteristika wie  $\beta$ -Amyloid-Vorkommen und Phospho-Tau zusammen mit glialen Reaktionen und morphologisch verändertem Endothel, das mit *Solanum tuberosum* Lektin (STL, Kartoffellektin) dargestellt wurde. Neben deutlichen morphologischen Veränderungen der Gefäßstrukturen kam es 24 Stunden nach Ischämie-Induktion zu einem drastischen Rückgang der Immunreaktivität für TH und ChAT als neuronalen Komponenten der NVU, vor allem im ischämie-betroffenen Striatum aber auch in ischämiefernen Arealen wie der ischämischen Grenzzone und dem ipsilateralen Neokortex. Aufgrund von Korrelationsanalysen, die eine gleichsinnige Degeneration des cholinergen Systems und des Endothels gezeigt haben, kann man von gleichzeitigen Veränderungen multipler Zelltypen innerhalb der NVU im Ischämie-betroffenen Gehirn mit Alzheimer-Phänotyp ausgehen. Ausgeprägter erschien der beschriebene Effekt auf cholinerge Komponenten jüngerer Mäusen zuzutreffen. Die vorgelegten Ergebnisse unterstreichen das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen innerhalb der NVU im Alzheimer-Gehirn mit ischämischen Veränderungen, einschließlich der Veränderungen des cholinergen Systems in Verbindung mit vaskulären Pathologien. Daher sollten neue Behandlungsstrategien neben bereits etablierten Ansätzen gegen neuronale Degeneration und Tau-Phosphorylierung auch auf zellulärer Ebene eingreifen, z.B. durch Stabilisierung der Integrität von endothelialen und glialen Elementen, eingreifen. Derartige Strategien könnten die Krankheitsentwicklung verzögern und das Krankheitsbild mildern.

# Literaturverzeichnis

- Ahmad A, Khan MM, Javed H, Raza SS, Ishrat T, Khan MB, et al. (2012) Edaravone ameliorates oxidative stress associated cholinergic dysfunction and limits apoptotic response following focal cerebral ischemia in rat. *Mol Cell Biochem*, 367(1-2):215–225.
- Amtul Z, Nikolova S, Gao L, Keeley RJ, Bechberger JF, Fisher AL, et al. (2014) Comorbid A $\beta$  toxicity and stroke: hippocampal atrophy, pathology, and cognitive deficit. *Neurobiol Aging*, 35(7):1605–1614.
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, et al. (2016) Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, 532(7598):195–200.
- Arendt T, Bigl V, Arendt A, Tennstedt A (1983) Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol*, 61(2):101–108.
- Association A (2016) 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 12:459–509.
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12(6):723–725.
- Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R (2002) Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol*, 68(3):209–245.
- Back T, Hemmen T, Schüler OG (2004) Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol*, 251(4):388–397.
- Baird AE, Benfield A, Schlaug G, Siewert B, Lovblad KO, Edelman RR, Warach S (1997) Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, 41(5):581–589.

- Bakker, Erik N T P, Bacsikai BJ, Arbel-Ornath M, Aldea R, Bedussi B, Morris AWJ, et al. (2016) Lymphatic Clearance of the Brain: Perivascular, Paravascular and Significance for Neurodegenerative Diseases. *Cell Mol Neurobiol*, 36(2):181–194.
- Banik A, Brown RE, Bamburg J, Lahiri DK, Khurana D, Friedland RP, et al. (2015) Translation of Pre-Clinical Studies into Successful Clinical Trials for Alzheimer’s Disease: What are the Roadblocks and How Can They Be Overcome? *Journal of Alzheimer’s disease : JAD*, 47:815–843.
- Barthel H, Schroeter ML, Hoffmann KT, Sabri O (2015) PET/MR in dementia and other neurodegenerative diseases. *Seminars in nuclear medicine*, 45:224–233.
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217(4558):408–414.
- Bauer AT, Bürgers HF, Rabie T, Marti HH (2010) Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(4):837–848.
- Beach TG, Walker R, McGeer EG (1989) Patterns of gliosis in Alzheimer’s disease and aging cerebrum. *Glia*, 2(6):420–436.
- Beckman JS (1994) Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann N Y Acad Sci*, 738:69–75.
- Bell RD, Zlokovic BV (2009) Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol*, 118(1):103–113.
- Benarroch EE (2012) Effects of acetylcholine in the striatum. Recent insights and therapeutic implications. *Neurology*, 79(3):274–281.
- Böttiger BW, Teschendorf P, Krumnikl JJ, Vogel P, Galmbacher R, Schmitz B, et al. (1999) Global cerebral ischemia due to cardiocirculatory arrest in mice causes neuronal degeneration and early induction of transcription factor genes in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, 65:135–142.
- Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5):e331–9.
- Caplan LR (2000) *Caplan’s stroke: A clinical approach*. 3. Aufl., Butterworth-Heinemann, Boston.

- Carter A (1963) Strokes. Natural history and prognosis. *Proc R Soc Med*, 56:483–486.
- Chiarini A, Armato U, Gardenal E, Gui L, Dal Prà I (2017) Amyloid  $\beta$ -Exposed Human Astrocytes Overproduce Phospho-Tau and Overrelease It within Exosomes, Effects Suppressed by Calcilytic NPS 2143-Further Implications for Alzheimer's Therapy. *Front Neurosci*, 11:217.
- Cipolla MJ (2010) *The cerebral circulation*, Bd. 2 von *Colloquium series on integrated systems physiology*. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Clarke JR, Lyra E Silva NM, Figueiredo CP, Frozza RL, Ledo JH, Beckman D, et al. (2015) Alzheimer-associated A $\beta$  oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol Med*, 7:190–210.
- Coyle JT, Price DL, DeLong (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219(4589):1184–1190.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262(5134):689–695.
- Crack PJ, Taylor JM (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med*, 38(11):1433–1444.
- Crews L, Masliah E (2010) Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*, 19(R1):R12–20.
- Crunkhorn S (2016) Neurodegenerative disease: Immunotherapy opportunity emerges for Alzheimer disease. *Nat Rev Drug Discov*, 15(3):158.
- Del Zoppo GJ (2009) Bleeding in the brain: Amyloid-beta may keep clots away. *Nature medicine*, 15:1132–1133.
- Devi L, Ohno M (2016) Cognitive benefits of memantine in Alzheimer's 5XFAD model mice decline during advanced disease stages. *Pharmacol Biochem Behav*, 144:60–66.
- Dirnagl U (2012) Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann N Y Acad Sci*, 1268:21–25.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22(9):391–397.

- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3):310–318.
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, 115:5–38.
- Dyrna F, Hanske S, Krueger M, Bechmann I (2013) The blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(4):763–773.
- Elder GA, Gama Sosa MA, de Gasperi R (2010) Transgenic mouse models of Alzheimer’s disease. *Mt Sinai J Med*, 77(1):69–81.
- Endres M, Engelhardt B, Koistinaho J, Lindvall O, Meairs S, Mohr JP, et al. (2008) Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis*, 25(3):268–278.
- Engel O, Akyuz L, da Costa Goncalves, Andrey C, Winek K, Dames C, Thielke M, et al. (2015) Cholinergic Pathway Suppresses Pulmonary Innate Immunity Facilitating Pneumonia After Stroke. *Stroke*, 46(11):3232–3240.
- Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V (2009) Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol*, 8:355–369.
- Ferrer I, Planas AM (2003) Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(4):329–339.
- Foerch C, Misselwitz B, Sitzer M, Steinmetz H, Neumann-Haefelin T, Group HSS (2008) The projected burden of stroke in the German federal state of Hesse up to the year 2050. *Dtsch Arztebl Int*, 105:467–473.
- Francis PT (2005) The interplay of neurotransmitters in Alzheimer’s disease. *CNS spectrums*, 10:6–9.
- Francis PT, Am Palmer, Snape M, Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer’s disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66(2):137–147.
- Frank S, Clavaguera F, Tolnay M (2008) Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, 115:39–53.

- Frost JL, Liu B, Rahfeld JU, Kleinschmidt M, O’Nuallain B, Le KX, et al. (2015) An anti-pyroglutamate-3 A $\beta$  vaccine reduces plaques and improves cognition in APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 mice. *Neurobiol Aging*, 36(12):3187–3199.
- Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL, del Zoppo GJ (2004) Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke*, 35(4):998–1004.
- Games D, Buttini M, Kobayashi D, Schenk D, Seubert P (2006) Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer’s disease. *Journal of Alzheimer’s disease : JAD*, 9:133–149.
- Geocadin RG, Eleff SM (2008) Cardiac arrest resuscitation: neurologic prognostication and brain death. *Curr Opinon Crit Care*, 14(3):261–268.
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *J Neural Transm Suppl*, 36:43–59.
- Gibson CL (2013) Cerebral ischemic stroke: is gender important? *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(9):1355–1361.
- Gillardon F, Böttiger B, Schmitz B, Zimmermann M, Hossmann KA (1997) Activation of CPP-32 protease in hippocampal neurons following ischemia and epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res*, 50(1-2):16–22.
- Ginsberg MD (1997) The new language of cerebral ischemia. *A J Neuroradiol*, 18(8):1435–1445.
- Ginsberg MD (2002) Hyperglycemia and stroke outcome: vindication of the ischemic penumbra. *Ann Neurol*, 52(1):5–6.
- Giraldo EA, Khalid A, Zand R (2011) Safety of Intravenous Thrombolysis within 4.5 h of symptom onset in patients with negative post-treatment stroke imaging for cerebral infarction. *Neurocrit Care*, 15(1):76–79.
- Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B (2016) Therapeutic strategies for Alzheimer’s disease in clinical trials. *Pharmacological reports : PR*, 68:127–138.
- Goldman L, La Cecil RF (2011) *Goldman’s Cecil Medicine*. 24. Aufl., Saunders, Philadelphia, Pa.



- Goldwaser EL, Acharya NK, Sarkar A, Godsey G, Nagele RG (2016) Breakdown of the Cerebrovasculature and Blood-Brain Barrier: A Mechanistic Link Between Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 54:445–456.
- González MI, Robinson MB (2004) Protein kinase C-dependent remodeling of glutamate transporter function. *Mol Interv*, 4(1):48–58.
- Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. (2016) Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet (London, England)*, 387:1723–1731.
- Gregory SG, Sekhon M, Schein J, Zhao S, Osoegawa K, Scott CE, et al. (2002) A physical map of the mouse genome. *Nature*, 418(6899):743–750.
- Götz J, Streffer JR, David D, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L, et al. (2004) Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol Psychiatry*, 9:664–683.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, et al. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 359(13):1317–1329.
- Hakim AM (1987) The cerebral ischemic penumbra. *Can J Neurol Sc*, 14(4):557–559.
- Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924):721–724.
- Hamann GF (1997) Der akute Hirninfarkt: Pathophysiologie und moderne Therapiekonzepte. *Radiologe*, 37(11):843–852.
- Hamel E, Royea J, Ongali B, Tong XK (2016) Neurovascular and Cognitive failure in Alzheimer's Disease: Benefits of Cardiovascular Therapy. *Cellular and molecular neurobiology*, 36:219–232.
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10(11):1387–1394.
- Hankey GJ (2017) Stroke. *Lancet*, 389:641–654.

- Härtig W, Goldhammer S, Bauer U, Wegner F, Wirths O, Bayer TA, Grosche J (2010a) Concomitant detection of beta-amyloid peptides with N-terminal truncation and different C-terminal endings in cortical plaques from cases with Alzheimer's disease, senile monkeys and triple transgenic mice. *J Chem Neuroanat*, 40:82–92.
- Härtig W, Kacza J, Paulke BR, Grosche J, Bauer U, Hoffmann A, et al. (2010b) In vivo labelling of hippocampal beta-amyloid in triple-transgenic mice with a fluorescent acetylcholinesterase inhibitor released from nanoparticles. *Eur J Neurosci*, 31:99–109.
- Härtig W, Reichenbach A, Voigt C, Boltze J, Bulavina L, Schuhmann MU, et al. (2009) Triple fluorescence labelling of neuronal, glial and vascular markers revealing pathological alterations in various animal models. *J Chem Neuroanat*, 37:128–138.
- Härtig W, Saul A, Kacza J, Grosche J, Goldhammer S, Michalski D, Wirths O (2014) Immunolesion-induced loss of cholinergic projection neurones promotes  $\beta$ -amyloidosis and tau hyperphosphorylation in the hippocampus of triple-transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40:106–120.
- Härtig W, Stieler J, Boerema AS, Wolf J, Schmidt U, Weissfuss J, et al. (2007) Hibernation model of tau phosphorylation in hamsters: selective vulnerability of cholinergic basal forebrain neurons - implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci*, 25:69–80.
- Hartmann A, Hunot S, Michel PP, Muriel MP, Vyas S, Faucheux BA, et al. (2000) Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6):2875–2880.
- Hartz AMS, Bauer B, Soldner ELB, Wolf A, Boy S, Backhaus R, et al. (2012) Amyloid- $\beta$  contributes to blood-brain barrier leakage in transgenic human amyloid precursor protein mice and in humans with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*, 43(2):514–523.
- Hawkes CA, Michalski D, Anders R, Nissel S, Grosche J, Bechmann I, et al. (2013) Stroke-induced opposite and age-dependent changes of vessel-associated

- markers in co-morbid transgenic mice with Alzheimer-like alterations. *Exp Neurol*, 250:270–281.
- Hecht N, He J, Kremenetskaia I, Nieminen M, Vajkoczy P, Woitzik J (2012) Cerebral hemodynamic reserve and vascular remodeling in C57/BL6 mice are influenced by age. *Stroke*, 43(11):3052–3062.
- Heikkinen R, Malm T, Heikkila J, Muona A, Tanila H, Koistinaho M, Koistinaho J (2014) Susceptibility to focal and global brain ischemia of Alzheimer mice displaying abeta deposits: effect of immunoglobulin. *Aging Dis*, 5(2):76–87.
- Hohman TJ, Samuels LR, Liu D, Gifford KA, Mukherjee S, Benson EM, et al. (2015) Stroke risk interacts with Alzheimer's disease biomarkers on brain aging outcomes. *Neurobiol Aging*, 36(9):2501–2508.
- Hossmann KA (2006) Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*, 26(7-8):1057–1083.
- Howlett DR, Richardson JC (2009) The pathology of APP transgenic mice: a model of Alzheimer's disease or simply overexpression of APP? *Histol Histopathol*, 24:83–100.
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 5(5):347–360.
- Iadecola C, Xu X, Zhang F, el Fakahany EE, Ross ME (1995) Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(1):52–59.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2002) Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*, 4(3):235–238.
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*, 24(3):173–182.
- Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, 9(1):119–128.

- Jayakumar AR, Norenberg MD (2010) The Na-K-Cl co-transporter in astrocyte swelling. *Metab Brain Dis*, 25(1):31–38.
- Jiao SS, Yao XQ, Liu YH, Wang QH, Zeng F, Lu JJ, et al. (2015) Edaravone alleviates Alzheimer’s disease-type pathologies and cognitive deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112:5225–5230.
- Kahle KT, Simard JM, Staley KJ, Nahed BV, Jones PS, Sun D (2009) Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology*, 24:257–265.
- Kalaria RN (2000) The role of cerebral ischemia in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*, 21(2):321–330.
- Kalaria RN (2009) Neurodegenerative disease: Diabetes, microvascular pathology and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 5(6):305–306.
- Kalaria RN (2016) Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol*, 131(5):659–685.
- Kato H, Kogure K (1999) Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. *Cell Mol Neurobiol*, 19(1):93–108.
- Keeley RJ, Hong NS, Fisher A, McDonald RJ (2015) Co-morbid beta-amyloid toxicity and stroke produce impairments in an ambiguous context task in rats without any impairment in spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem*, 119:42–51.
- Kemppainen S, Hamalainen E, Miettinen PO, Koistinaho J, Tanila H (2014) Behavioral and neuropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model mice. *Behav Brain Res*, 275:15–26.
- Kempinski OS (1994) Neuroprotektion. Modelle und Grundprinzipien. *Anaesthesist*, 43 Suppl 2:S25–33.
- Kerr JF (1965) A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol*, 90(2):419–435.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239–257.

- Klöppel S, Abdulkadir A, Jack CR, Koutsouleris N, Mourão-Miranda J, Vemuri P (2012) Diagnostic neuroimaging across diseases. *Neuroimage*, 61(2):457–463.
- Koike MA, Garcia FG, Kitazawa M, Green KN, LaFerla FM (2011) Long term changes in phospho-APP and tau aggregation in the 3xTg-AD mice following cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 495(1):55–59.
- Koizumi K, Wang G, Park L (2016) Endothelial Dysfunction and Amyloid- $\beta$ -Induced Neurovascular Alterations. *Cellular and molecular neurobiology*, 36:155–165.
- Kokjohn TA, Roher AE (2009) Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer’s disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimers Dement*, 5(4):340–347.
- Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU (2002) Inzidenz, Atiologie und Langzeitprognose des Schlaganfalls. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 70(12):657–662.
- Krueger M, Bechmann I, Immig K, Reichenbach A, Härtig W, Michalski D (2014) Blood–brain barrier breakdown involves four distinct stages of vascular damage in various models of experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(2):292–303.
- Krueger M, Härtig W, Reichenbach A, Bechmann I, Michalski D (2013) Blood-Brain Barrier Breakdown after Embolic Stroke in Rats Occurs without Ultrastructural Evidence for Disrupting Tight Junctions. *PLoS ONE*, 8(2):e56419.
- Kruyer A, Soplop N, Strickland S, Norris EH (2015) Chronic Hypertension Leads to Neurodegeneration in the TgSwDI Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*, 66:175–182.
- Kulshreshtha A, Piplani P (2016) Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer’s disease. *Neurol Sci*, 37(9):1403–1435.
- Kunst AE, Amiri M, Janssen F (2011) The decline in stroke mortality: exploration of future trends in 7 Western European countries. *Stroke*, 42:2126–2130.
- Kurata T, Lukic V, Kozuki M, Wada D, Miyazaki K, Morimoto N, et al. (2014) Telmisartan reduces progressive accumulation of cellular amyloid beta and phosphorylated tau with inflammatory responses in aged spontaneously hypertensive stroke resistant rat. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 23:2580–2590.

- Kwon I, Kim EH, del Zoppo GJ, Heo JH (2009) Ultrastructural and temporal changes of the microvascular basement membrane and astrocyte interface following focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 87(3):668–676.
- Lee JH, Oh IH, Lim HK (2016) Stem Cell Therapy: A Prospective Treatment for Alzheimer's Disease. *Psychiatry investigation*, 13:583–589.
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW (2000) Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*, 106(6):723–731.
- Leist M, Nicotera P (1998) Apoptosis versus necrosis: the shape of neuronal cell death. *Results Probl Cell Differ*, 24:105–135.
- Li ZS, Furness JB (1998) Immunohistochemical localisation of cholinergic markers in putative intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res*, 294(1):35–43.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79(4):1431–1568.
- Love S, Miners JS (2016) Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 131(5):645–658.
- Majd S, Power JHT, Koblar SA, Grantham HJM (2016) Early glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and protein phosphatase 2A independent tau dephosphorylation during global brain ischaemia and reperfusion following cardiac arrest and the role of the adenosine monophosphate kinase pathway. *The European journal of neuroscience*, 44:1987–1997.
- Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol*, 8(11):425–427.
- Mastrangelo MA, Bowers WJ (2008) Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci*, 9:81.
- Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF (2000) Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res*, 301(1):173–187.
- Mattsson N, Carrillo MC, Dean RA, Devous MD, Nikolcheva T, Pesini P, et al. (2015) Revolutionizing Alzheimer's disease and clinical trials through biomarkers. *Alzheimers Dement*, 1(4):412–419.

- Medeiros R, LaFerla FM (2013) Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol*, 239:133–138.
- Menzies SA, Hoff JT, Betz AL (1992) Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, 31:100–6; discussion 106–7.
- Mesulam M (2004) The cholinergic lesion of Alzheimer’s disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem*, 11(1):43–49.
- Mhairi Macrae I (1992) New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol*, 34(4):302–308.
- Michalski D, Küppers-Tiedt L, Weise C, Laignel F, Härtig W, Raviolo M, et al. (2009) Long-term functional and neurological outcome after simultaneous treatment with tissue-plasminogen activator and hyperbaric oxygen in early phase of embolic stroke in rats. *Brain Res*, 1303:161–168.
- Michalski D, Preißler H, Hofmann S, Kacza J, Hartig W (2016) Decline of microtubule-associated protein tau after experimental stroke in differently aged wild-type and 3xTg mice with Alzheimer-like alterations. *Neuroscience*, 330:1–11.
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993) Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport*, 4(6):709–711.
- Milner E, Zhou ML, Johnson AW, Vellimana AK, Greenberg JK, Holtzman DM, et al. (2014) Cerebral amyloid angiopathy increases susceptibility to infarction after focal cerebral ischemia in Tg2576 mice. *Stroke*, 45(10):3064–3069.
- Molinoff PB, Axelrod J (1971) Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem*, 40:465–500.
- Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, et al. (2012) National Institute on Aging-Alzheimer’s Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease: a practical approach. *Acta neuropathologica*, 123:1–11.
- Morris AWJ, Sharp MM, Albargothy NJ, Fernandes R, Hawkes CA, Verma A, et al. (2016) Vascular basement membranes as pathways for the passage of fluid into and out of the brain. *Acta Neuropathol*, 131(5):725–736.

- Nakamura H, Strong AJ, Dohmen C, Sakowitz OW, Vollmar S, Sué M, et al. (2010) Spreading depolarizations cycle around and enlarge focal ischaemic brain lesions. *Brain*, 133(Pt 7):1994–2006.
- Namura T, Arai S, Koike A, Yamada S, Totani M, Ikemoto M (2010) [Possible mechanism for regulation of inflammatory responses with the S100A8/A9 protein]. *Rinsho Byori*, 58(7):651–657, japanese.
- Nedergaard M, Astrup J (1986) Infarct rim: effect of hyperglycemia on direct current potential and [14C]2-deoxyglucose phosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 6(5):607–615.
- Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV (2016) Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta*, 1862(5):887–900.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. (2012) Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(5):362–381.
- Nicholson RM, Kusne Y, Nowak LA, LaFerla FM, Reiman EM, Valla J (2010) Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer’s disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models. *Brain Res*, 1347:179–185.
- Nicolakakis N, Hamel E (2011) Neurovascular function in Alzheimer’s disease patients and experimental models. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(6):1354–1370.
- Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP (2016) Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia*, 64(2):300–316.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*, 24(8):1063–1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. (2003b) Triple-transgenic model of Alzheimer’s disease with plaques and tangles: intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3):409–421.



- Offner H (2014) Modeling immunity and inflammation in stroke: don't be afraid of mice? *Stroke*, 45(9):e181–2.
- Oh KJ, Perez SE, Lagalwar S, Vana L, Binder L, Mufson EJ (2010) Staging of Alzheimer's pathology in triple transgenic mice: a light and electron microscopic analysis. *J Alzheimers Dis*, 2010.
- Olney JW, Sharpe LG (1969) Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science*, 166(3903):386–388.
- Olsen TS, Larsen B, Herning M, Skriver EB, Lassen NA (1983) Blood flow and vascular reactivity in collaterally perfused brain tissue. Evidence of an ischemic penumbra in patients with acute stroke. *Stroke*, 14(3):332–341.
- Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW (2001) Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies. *Anaesthesist*, 50(12):905–920.
- Pannell M, Meier MA, Szulzewsky F, Matyash V, Endres M, Kronenberg G, et al. (2014) The subpopulation of microglia expressing functional muscarinic acetylcholine receptors expands in stroke and Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct*, 221(2):1157–1172.
- Pappas BA, Bayley PJ, Bui BK, Hansen LA, Thal LJ (2000) Choline acetyltransferase activity and cognitive domain scores of Alzheimer's patients. *Neurobiol Aging*, 21(1):11–17.
- Pekny M, Pekna M (2016) Reactive gliosis in the pathogenesis of CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1862(3):483–491.
- Perry EK (1986) The cholinergic hypothesis—ten years on. *Br Med Bull*, 42(1):63–69.
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *N Engl J M*, 362(4):329–344.
- Ritzel RM, Patel AR, Pan S, Crapser J, Hammond M, Jellison E, McCullough LD (2015) Age- and location-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging*, 36(6):2153–2163.
- Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A (2016) Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 323:170–182.

- Rohn TT, Head E, Su JH, Anderson AJ, Bahr BA, Cotman CW, Cribbs DH (2001) Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 158(1):189–198.
- Saavedra JM (2016) Evidence to Consider Angiotensin II Receptor Blockers for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *Cellular and molecular neurobiology*, 36:259–279.
- Sabogal AM, Arango CA, Cardona GP, Cespedes AE (2014) Atorvastatin protects GABAergic and dopaminergic neurons in the nigrostriatal system in an experimental rat model of transient focal cerebral ischemia. *Biomedica*, 34(2):207–217.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, et al. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400:173–177.
- Schliebs R (2005) Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease—interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. *Neurochem Res*, 30(6-7):895–908.
- Schliebs R, Arendt T (2006) The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 113(11):1625–1644.
- Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*, 221(2):555–563.
- Schulz V, Gross R, Pasch T, Busse J, Loeschke G (1982) Cyanide toxicity of sodium nitroprusside in therapeutic use with and without sodium thiosulphate. *Klin Wochenschr*, 60(22):1393–1400.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8(6):595–608.
- Sena ES, Briscoe CL, Howells DW, Donnan GA, Sandercock PAG, Macleod MR (2010) Factors affecting the apparent efficacy and safety of tissue plasminogen activator in thrombotic occlusion models of stroke: systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(12):1905–1913.
- Sharp FR, Jickling GC (2014) Modeling immunity and inflammation in stroke: differences between rodents and humans? *Stroke*, 45(9):e179–80.

- Siesjö BK (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg*, 77(3):337–354.
- Springer JE, Azbill RD, Knapp PE (1999) Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, 5(8):943–946.
- Stanimirovic DB, Friedman A (2012) Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(7):1207–1221.
- Streit WJ (2004) Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res*, 77(1):1–8.
- Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I (2014) Microglial pathology. *Acta neuropathologica communications*, 2:142.
- Sugawara T, Chan PH (2003) Reactive oxygen radicals and pathogenesis of neuronal death after cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal*, 5(5):597–607.
- Symon L, Lassen NA, Astrup J, Branston NM (1977) Thresholds of ischaemia in brain cortex. *Adv Exp Med Biol*, 94:775–782.
- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6(8):662–680.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koos T, Ibanez-Sandoval O (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat*, 4:150.
- Terry RD (1994) Neuropathological changes in Alzheimer disease. *Prog Brain Res*, 101:383–390.
- Thiel A, Cechetto DF, Heiss WD, Hachinski V, Whitehead SN (2014) Amyloid burden, neuroinflammation, and links to cognitive decline after ischemic stroke. *Stroke*, 45(9):2825–2829.
- Trojanowski JQ, Lee VM (2000) "Fatal attractions" of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 924:62–67.
- Truelsen T, Piechowski-Józwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogousslavsky J, Boysen G (2006) Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol*, 13:581–598.

- van Lint P, Libert C (2007) Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukocyte Biol*, 82(6):1375–1381.
- Vishal S, Sourabh A, Harkirat S (2011) Alois Alzheimer (1864-1915) and the Alzheimer syndrome. *J Med Biogr*, 19(1):32–33.
- Wang X, Li J, Qian L, Zang XF, Zhang SY, Wang XY, et al. (2013) Icaritin promotes histone acetylation and attenuates post-stroke cognitive impairment in the central cholinergic circuits of mice. *Neuroscience*, 236:281–288.
- Whitehouse PJ, Struble RG, Clark AW, Price DL (1982) Alzheimer disease: plaques, tangles, and the basal forebrain. *Ann Neurol*, 12(5):494.
- Yata K, Nishimura Y, Uekawa M, Tomita Y, Suzuki N, Tanaka T, et al. (2014) In vivo imaging of the mouse neurovascular unit under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*, 45:3698–3703.
- Zhang F, Eckman C, Younkin S, Hsiao KK, Iadecola C (1997) Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 17(20):7655–7661.
- Zhang L, Zhang ZG, Chopp M (2012a) The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. *Trends Pharmacol Sci*, 33(8):415–422.
- Zhang Q, Gao T, Luo Y, Chen X, Gao G, Gao X, et al. (2012b) Transient focal cerebral ischemia/reperfusion induces early and chronic axonal changes in rats: its importance for the risk of Alzheimer’s disease. *PLoS One*, 7(3):e33722.
- Zhang ZG, Chopp M, Gautam S, Zaloga C, Zhang RL, Schmidt HH, et al. (1994) Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res*, 654(1):85–95.
- Zhao BQ, Tejima E, Lo EH (2007) Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke*, 38(2 Suppl):748–752.
- Zhou J, Yu JT, Wang HF, Meng XF, Tan CC, Wang J, et al. (2015) Association between stroke and Alzheimer’s disease: systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis*, 43(2):479–489.

- Zlokovic BV (2008a) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2):178–201.
- Zlokovic BV (2008b) New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer’s disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 5:409–414.
- del Zoppo GJ (2009) Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 158:972–982.
- del Zoppo GJ (2010) The neurovascular unit in the setting of stroke. *Journal of internal medicine*, 267:156–171.
- del Zoppo GJ (2012) Aging and the neurovascular unit. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1268:127–133.
- del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Berg GI, Koziol JA (2007) Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke*, 38:646–651.

## 7 Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

---

Datum

---

Unterschrift

## 8 Publikationen

Michalski M, Hofmann S, Pitsch R, Grosche J, Härtig W. Neurovascular specifications in the Alzheimer-like brain of mice affected by focal cerebral ischemia – implications for future therapies. *J Alzheimers Dis* (im Druck).

Härtig W, Krueger M, Hofmann S, Preißler H, Märkel M, Frydrychowicz C, Mueller WC, Bechmann I, Michalski D (2016) Up-regulation of neurofilament light chains is associated with diminished immunoreactivities for MAP2 and tau after ischemic stroke in rodents and in a human case. *J Chem Neuroanat.* 2016; 78:140-148.

Michalski D, Preißler H, Hofmann S, Kacza J, Härtig W (2016) Decline of microtubule-associated protein tau after experimental stroke in differently aged wild-type and 3xTg mice with Alzheimer-like alterations. *Neuroscience.* 2016; 330:1-11.

Schmidt F, Boltze J, Jäger C, Hofmann S, Willems N, Seeger J, Härtig W, Stolzing A (2015) Detection and quantification of  $\beta$ -Amyloid, pyroglutamyl A $\beta$ , and tau in aged canines. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015; 74:912-923.

# 9 Lebenslauf

## Persönliche Daten

|                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
|                   | Sarah Hofmann                      |
| Geburtsdatum/-ort | 27. Oktober 1990 in Leipzig        |
| Anschrift         | Hinrichsenstraße 26, 04105 Leipzig |
| Telefonnummer     | 01 57 71 59 75 39                  |
| E-Mail-Adresse    | sarah-hofmann@web.de               |

## Schul- und Berufsausbildung

|                          |   |
|--------------------------|---|
| Juni 2016                | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (mündlich)<br>Approbation als Ärztin   |
| Mai 2015 -<br>April 2016 | Praktisches Jahr<br>1. Tertial:<br>Rechtsmedizin, Universität Leipzig<br>Radiologie, Universität Leipzig<br>2. Tertial:<br>Innere Medizin, Sankt Elisabeth-Krankenhaus, Leipzig<br>3. Tertial:<br>Neurochirurgie, Inselspital Bern, Schweiz<br>Viszeralchirurgie, Inselspital Bern, Schweiz |



|                             |  |
|-----------------------------|--|
| November 2014 -<br>Mai 2015 | Studentische Hilfskraftstelle,<br>Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,<br>Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Leipzig |
| Oktober 2014                | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (schriftlich)   |
| seit 2013                   | Doktorandin am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung<br>Medizinische Fakultät der Universität Leipzig                                 |
| April 2012 -<br>Juni 2016   | Universität Leipzig<br>Studiengang: Humanmedizin   |
| Oktober 2009 -<br>März 2012 | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg<br>Studiengang: Humanmedizin<br>Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung                       |
| 1997 - 2009                 | Max-Klinger-Gymnasium, Leipzig   |

# 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Härtig für die Überlassung des Dissertationsthemas, die fachlich exzellente und stets herzliche Betreuung sowie die Möglichkeit, verschiedene wissenschaftliche Einrichtungen zu besuchen. Ich danke ihm für die stets zeitnahe und akribische Korrektur meiner Arbeit, viele gute Ratschläge und die motivierende Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin PD Dr. med. Dominik Michalski für sein enormes zeitliches und persönliches Engagement bei der Durchführung der Studie, für die Operation der Mäuse, der Hilfe bei der statistischen Aufarbeitung sowie für zahlreiche kritische und konstruktive Denkanstöße bei der Fertigstellung der Arbeit.

Besonders danken möchte ich auch unserer Doktorandengruppe: Rebecca Anders, Simon Appel, Martin Märkel, Sabine Nissel, Anna-Lena Keck, Roman Pitsch und Hartmut Preissler. Danke für viele schöne Stunden in und außerhalb des Labors.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Paul-Flechsig-Instituts für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit während meiner praktischen Arbeit bedanken.

Dankbar bin ich Dr. Roxana Carare und Dr. Cheryl Hawkes für die interessante Kooperation und die Möglichkeit, vielfältige Einblicke in ihre Forschungsgruppe zu bekommen.

Herrn Dr. Jens Grosche danke ich für zahlreiche Abbildungen mit dem Laserscanningmikroskop.

Ganz besonders herzlich danke ich Roman für seine liebevolle Unterstützung.

# Abbildungsverzeichnis

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.1 | Übersicht Hirnarterien. Nach Blumenfeld, 2002. . . . .   | 3  |
| 1.2 | Die Neurovaskuläre Einheit und ihre Funktionen. Nach Zlokovic, 2008  | 4  |
| 1.3 | Zeitlicher Verlauf pathologischer Veränderungen nach zerebraler<br>Ischämie. Nach Dirnagl et al. 1999. . . . .                     | 6  |
| 1.4 | Pathophysiologische Mechanismen nach fokaler Ischämie. Nach Dirnagl<br>et al. 1999. . . . .  | 7  |
| 1.5 | Organisation cholinergischer Leitungsbahnen im Rattenhirn . . . . .  | 16 |
| 1.6 | Katecholaminsynthese. Nach Goridis und Rohrer 2002. . . . .  | 18 |
| 3.1 | Schematische Darstellung eines Konfokalmikroskops. Spektrum Aka-<br>demischer Verlag, Heidelberg 2010. . . . .                     | 30 |
| 3.2 | Ausgewählte Schnittebenen aus dem Maushirn-Atlas. Nach Paxinos<br>und Franklin 1998. . . . .                                       | 31 |
| 4.1 | Alzheimer-artige Veränderungen in 3xTg-Mäusen sowie gliovaskuläre<br>striatale Veränderungen einen Tag nach Schlaganfall . . . . . | 36 |
| 4.2 | Doppelfluoreszenzmarkierung von ChAT und STL in 12 Monate alter<br>WT-Maus nach Schlaganfall . . . . .                             | 38 |
| 4.3 | Doppelfluoreszenzmarkierung von TH und STL in 3 Monate alter<br>3xTg-Maus nach Schlaganfall . . . . .                              | 40 |
| 4.4 | ChAT, TH und STL im Striatum einer 3 Monate alten WT-Maus nach<br>Schlaganfall . . . . .   | 42 |
| 4.5 | Streudiagramme aller Ergebnisse zu Veränderungen von STL und<br>ChAT nach Schlaganfall . . . . .                                   | 43 |
| 4.6 | Gefäß-Doppelmarkierung von Kollagen-IV und STL kombiniert mit<br>ChAT oder TH . . . . .  | 44 |
| 4.7 | Übersicht zum Auswerteverfahren . . . . .  | 46 |
| 4.8 | Quantifizierung von ChAT- und TH-Immunfluoreszenz . . . . .  | 48 |

# Tabellenverzeichnis

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.1 | Symptome bei einem akuten ischämischen/hämorrhagischen Schlaganfall geordnet nach Lokalisation . . . . . | 1  |
| 3.1 | Verwendete Chemikalien und Hersteller bzw. Lieferanten . . . . .   | 24 |
| 3.2 | Verwendete Lösungen und Hersteller . . . . .   | 24 |
| 3.3 | Mehrfach Immunfluoreszenzmarkierungen . . . . .  | 29 |