

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Astrozyten- und mikroglia-spezifische mitochondriale DNA-Deletionen
und
neuroinflammations-assoziierte Genexpression
bei sporadischer Alzheimer-Demenz**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sabrina Luise Strobel

aus Boxberg-Bobstadt

Würzburg, Juli 2018

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu

Korreferent/in: Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2019

Die Promovendin ist Ärztin.

**In Erinnerung an meine liebe Mutter Magdalena
† 26.06.2013**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Morbus Alzheimer: Definition und Neuropathologie	1
1.2 Stadieneinteilung.....	2
1.3 Theorien zur Pathogenese der sporadischen Alzheimer-Erkrankung	4
1.4 Zielsetzung der Arbeit und Auswahl der zu untersuchenden Hirnregionen und Zelltypen	8
2. Material und Methoden	10
2.1 Geräte	10
2.2 Software	10
2.3 Antikörper.....	11
2.4 Primer	11
2.5 Sonden.....	11
2.6 TaqMan® Gene Expression Assays	11
2.7 Kits	12
2.8 Reagenzien	12
2.9 Ge- und Verbrauchsmaterialien	12
2.10 Humanes Blut, Muskelgewebe mit Kearns-Sayre-Syndrom (KSS)	13
2.11 Humanes Gehirngewebe	13
2.12 Zuschneiden von Gehirngewebe.....	15
2.13 Anfertigen von Gewebeschnitten für die Laser-Mikrodissektion.....	16
2.14 Immunhistochemie	16
2.14.1 CD68 Färbung	17
2.14.2 GFAP Färbung.....	19
2.15 Kresylviolett-färbung.....	19
2.16 Laser-Mikrodissektion für die Gewinnung von DNA.....	21
2.17 DNA-Isolierung aus mikrodissezierten Zellen.....	23
2.18 DNA-Isolierung aus Vollblut und Muskelgewebe (KSS)	23
2.19 Quantitative Real-Time-PCR mtDNA Deletionen	24
2.20 Auswertung der mtDNA Deletionen	27
2.20.1 Relative Quantifizierung	27

2.20.2	Statistische Auswertung der Daten	28
2.21	Anfertigen von Gewebeschnitten für die Validierung der Gene.....	28
2.22	RNA-Isolierung aus Gewebehomogenat.....	28
2.23	Bestimmung der RNA Integrity Number (RIN).....	29
2.24	cDNA-Synthese von RNA	30
2.25	Validierung der Gene mittels Real-Time-PCR.....	30
2.26	Auswertung der Genexpression	30
2.26.1	Normalisierung der Daten aus der quantitativen Real-Time-PCR... 30	
2.26.2	Statistische Auswertung der Daten	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Mitochondriale Deletionen.....	32
3.1.1	Demographische Daten	32
3.1.2	mtDNA-Deletionsanteile der Astrozyten.....	33
3.1.3	mtDNA-Deletionsanteile der Mikroglia	36
3.2	Genexpressionsanalyse.....	39
3.2.1	Demographische Daten	39
3.2.2	CX3CL1	40
3.2.3	TREM2.....	42
3.2.4	PPAR γ	45
4.	Diskussion	47
4.1	Mitochondriale Deletionen.....	47
4.2	Genexpressionanalyse.....	50
5.	Zusammenfassung.....	52
6.	Verzeichnisse	54
6.1	Literaturverzeichnis	54
6.2	Abkürzungsverzeichnis	58
6.3	Abbildungsverzeichnis	60
6.4	Tabellenverzeichnis.....	60

1. Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer: Definition und Neuropathologie

Neurodegenerative Erkrankungen zählen zu den häufigsten Erkrankungen im höheren Lebensalter. Die Versorgung der stetig wachsenden Anzahl an demenzkranken Menschen ist aktuell eine der größten sozial- und gesundheitspolitischen Herausforderungen unserer Gesellschaft.

Die meisten neurodegenerativen Erkrankungen sind durch pathologische Ablagerungen filamentöser Proteine charakterisiert, die sowohl extra- als auch intrazellulär in Form von zytoplasmatischen oder intranukleären Einschlüssen vorkommen[1].

Der Morbus Alzheimer ist weltweit die häufigste Ursache einer Demenz (<https://www.alz.co.uk>). Als „eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ benannte Alois Alzheimer das Krankheitsbild, das sich ihm durch Auguste Deter eröffnete. Die damals 51-Jährige wurde im November 1901 in die psychiatrische Klinik in Frankfurt eingeliefert. Sie zeigte Symptome der Verwirrtheit, Desorientierung und Vergesslichkeit. Nach viereinhalbjähriger Krankheitsdauer verstarb Auguste Deter schließlich. Bei der Gehirnobduktion stellte Alois Alzheimer makroskopisch eine ausgeprägte Gehirnatrophie sowie arteriosklerotische Veränderungen der großen Hirnarterien fest. Mikroskopisch fand er veränderte Neurofibrillen innerhalb und zahlreiche Ablagerungen (sog. senile Plaques) außerhalb der Nervenzellen - die charakteristischen, neuropathologischen Korrelate der Alzheimer-Krankheit[2]. Basierend auf den von Alois Alzheimer erhobenen Befunden betitelte Emil Kraepelin die Krankheit 1910 erstmals als Alzheimersche Demenz (AD)[3].

Wesentlicher Bestandteil der senilen Plaques ist das Amyloid- β -Peptid, ein Spaltprodukt eines häufig vorkommenden Membranproteins, dem sog. Amyloidvorläuferprotein („amyloid precursor protein“, APP), während die Neurofibrillen (Alzheimer-Fibrillen, „neurofibrilläre Tangles“, NFT) aus intrazellulären Aggregaten des hyperphosphorylierten tau-Proteins bestehen[4]. Diese Veränderungen, die durch „Akkumulation“ von pathologischen Proteinen

entstehen, werden in der Literatur als sog. „positive“ Läsionen angesehen. Dagegen gilt der Verlust von Nervenzellen/Synapsen, ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Neurodegeneration, als „negative“ Läsion. Dadurch verliert das Gehirn zunehmend an Substanz und wirkt in fortgeschrittenen Stadien deutlich atrophisch. Die reaktiven Prozesse im Hirngewebe stellen die dritte Säule der feingeweblichen Veränderungen dar und werden hauptsächlich von den Mikrogliazellen und den Astrozyten getragen[5].

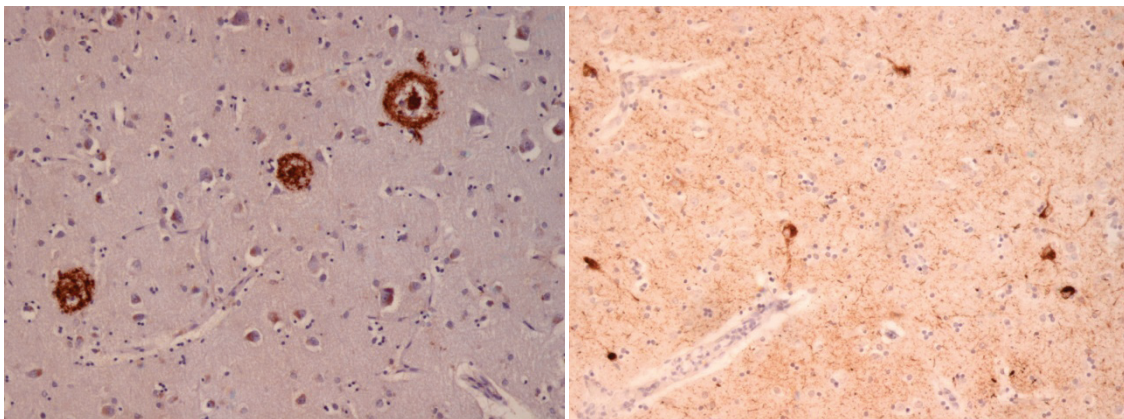


Abbildung 1: Darstellung der neuropathologischen Veränderungen bei AD, Vergrößerung: 100x, links: β -Amyloid-Plaques, rechts: neurofibrilläre Tangles.

1.2 Stadieneinteilung

Die oben genannten Veränderungen im Hirngewebe durchlaufen ein charakteristisches Ausbreitungsmuster während des Krankheitsverlaufes. Hieraus ergibt sich die Erkenntnis einer selektiven Vulnerabilität verschiedener Hirnareale in Bezug auf die Erkrankung. Auf diese Beobachtung stützen sich alle gängigen Protokolle zur Stadieneinteilung der Alzheimer-Erkrankung.

Bereits Anfang der 90er Jahre ist Heiko und Eva Braak eine Einteilung der Erkrankung in sechs Stadien (I-VI) gelungen. Die Krankheit beginnt laut ihren Erkenntnissen in der Hippokampusregion und befällt nach und nach immer mehr Gehirnareale, in einer bestimmten und immer gleichbleibenden Reihenfolge. Die Anzahl der bereits befallenen Regionen spiegelt den Fortschrittsgrad der Erkrankung nach Braak und Braak wider[6]. Die ersten Tangles, die im Stadium I am Übergang zwischen dem entorhinalen Kortex und

dem temporalen Isokortex (der sog. transentorhinalen Rinde) zu finden sind, breiten sich auf die Entorhinalrinde aus (Stadium II). Im weiteren Verlauf erreichen die Veränderungen den CA1-Sektor des Hippocampus (Stadium III), später auch einzelne isokortikale Bezirke, insbesondere im unteren Temporallappen (Stadium IV). In den späteren Stadien werden ausgedehnte Gebiete des Assoziationskortex in allen Lappen betroffen, wobei die primären Rindenfelder ausgespart bleiben (Stadium V). Schließlich ist die gesamte Großhirnrinde betroffen (Stadium VI)

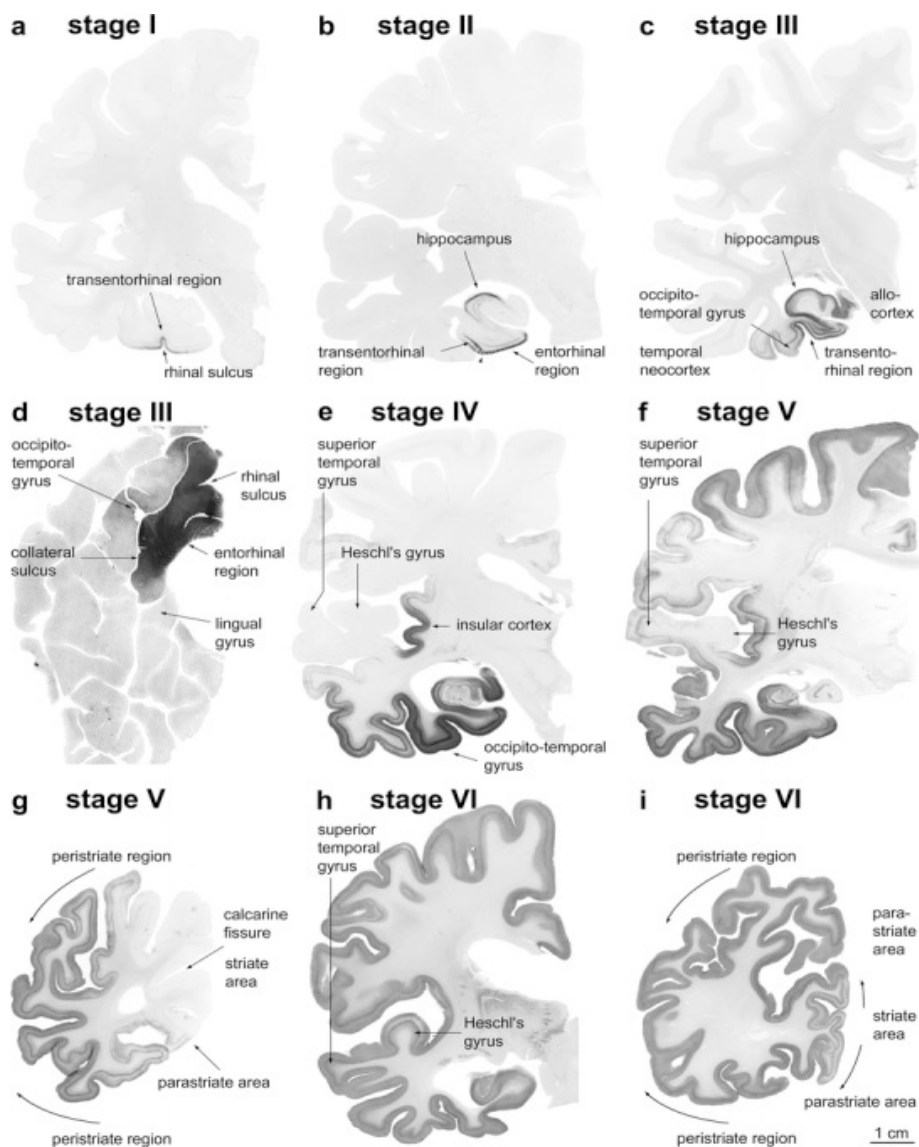


Abbildung 2: Schematische Darstellung der neuritischen Alzheimer-Pathologie nach Braak und Braak 1991[7], mit freundlicher Genehmigung durch die Autoren.

Das sogenannte CERAD-Protokoll basiert auf einer semiquantitativen Auswertung der Dichte neuritischer Plaques, bei einer Vergrößerung von 100x, und wurde vom **Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease** (CERAD) entwickelt. Diese wird in Abhängigkeit vom Patientenalter und Dichte der Plaques gewertet und ergibt einen altersabhängigen Plaque-Score (A, B und C)[8].

1.3 Theorien zur Pathogenese der sporadischen Alzheimer-Erkrankung

Die Demenz vom Alzheimer Typ tritt sowohl sporadisch, als auch familiär auf, wobei sich die familiäre AD schon in einem Alter von unter 60 Jahren manifestiert und daher auch als early-onset familial AD (EOFAD) bezeichnet wird. Diese Form macht nur einen kleinen Anteil aller Fälle aus (<5%)[9] und ist offenbar durch autosomal-dominant erbliche Mutationen in einem der drei sog. „early-onset AD“ - Gene bedingt: Das Amyloid-beta Vorläufer Protein (APP) auf Chromosom 21, das Presenilin-Gen 1 (PSEN1) auf Chromosom 14 und das Presenilin-Gen 2 (PSEN2) auf Chromosom 1[10].

Als Risikofaktor für die weitaus häufigere, sporadisch auftretende AD-Form, die sog. late-onset AD (LOAD), ist das Apolipoprotein E4 (ApoE4) bekannt, wobei diese Form eine multifaktorielle und weitgehend noch ungeklärte Pathogenese aufweist[11].

Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit der sporadischen Form der Erkrankung.

In den letzten Jahren sind zahlreiche Hypothesen zur Entstehung und zum Verlauf der sporadischen Alzheimer-Erkrankung formuliert worden, wobei keine dieser Theorien die Pathogenese gänzlich erklären kann. Eine der Hypothesen beruht auf der Tatsache, dass abnorm phosphoryliertes tau-Protein als erste Veränderung noch vor dem Auftreten von Amyloid- β zu beobachten ist (sog. tau-Hypothese), sogar bereits in jungen Jahren[12]. Diese Theorie wird auch durch die Evidenz von Neurodegeneration bei sog. Tauopathien, die ohne Ablagerungen von Amyloid- β zustande kommen (z. B. die kortiko-basale

Degeneration oder die progressive supranukleäre Blickparese), unterstützt. Wann und durch welche Mechanismen die Hyperphosphorylierung gestartet und getriggert wird, ist noch weitgehend unklar.

Die Amyloid-Kaskade-Hypothese[13] unterstützt dagegen die Theorie, dass AD durch abnorme Amyloid- β Prozessierung entsteht und die Amyloid-Ablagerungen in der Folge zu der Hyperphosphorylierung von tau-Protein und damit zur Entstehung von NFT führen. Die Bildung von Amyloid-Plaques aktiviert nach anderen Theorien die Mikroglia und die Astrozyten. Es kommt zur Neuroinflammation, welche die Ionenhomöostase der Nervenzelle stört. Hinzu kommen der oxidative Stress sowie die Alteration der Kinasen-/Phosphatasen-Aktivität, die eine Hyperphosphorylierung des tau-Proteins begünstigt und somit zur Bildung von NFTs führt[14].

Eine weitere Theorie ist die der freien Radikale. Diese ist eine der am besten belegten Alterungstheorien und postuliert ein altersabhängiges Nachlassen der Organfunktion in Folge von oxidativen Schäden durch freie Radikale an Biomolekülen, insbesondere der mitochondrialen DNA (mtDNA). In Geweben mit sehr hohem Sauerstoffverbrauch, wie dem Gehirn, dem Herzen oder der Skelettmuskulatur, sind die Schädigungen der Mitochondrien stark ausgeprägt. Die Alterationen der mtDNA umfassen oxidative Schäden der Basenpaare (bp), Punktmutationen, Deletionen oder Duplikationen. Die häufigste Deletion ist 4977 bp lang und zeigt eine altersabhängige Zunahme in postmitotischen Geweben[15]. Die Bedeutung und Quantifizierung dieser Deletionen im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung ist in einzelnen Publikationen mit unterschiedlichen Ergebnissen festgehalten. Manche Autoren berichten über eine ausgeprägte Akkumulation an Deletionen im Gehirn von Alzheimer-Patienten unter 75 Jahren und einem Abfall bei Patienten, die älter als 75 Jahre sind, im Vergleich zu Kontrollen[16], während andere Autoren keine Unterschiede zwischen Alzheimer-Patienten und altersangepassten Kontrollen nachweisen konnten[17]. Hierbei wurden Untersuchungen an Gewebehomogenaten durchgeführt, es handelt sich somit nicht um eine zelltypspezifische Analyse. Einzelne zellspezifische Analysen wurden an Nervenzellen durchgeführt[18],

während derartige Einzelzell-Untersuchungen in anderen Zelltypen des Gehirns (Mikroglia, Astrozyten) bislang noch nicht publiziert wurden.

Wie bereits erwähnt, werden neben den Nervenzellen auch Astrozyten[19] und Mikroglia[20, 21] eine wichtige Rolle im Prozess der Neurodegeneration zugeschrieben.

Die Astrozyten, zu deren physiologischen Funktionen die metabolische Unterstützung von Neuronen, die Regulation der extrazellulären Ionenkonzentration, das Aufrechterhalten der Blut-Hirn-Schranke sowie eine Immunfunktion gehören[22], durchlaufen ebenfalls Veränderungen im Krankheitsverlauf, wobei deren Bedeutung nicht vollständig geklärt ist. So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass hypertrophe, reaktive Astrozyten in der Umgebung von neuritischen Plaques akkumulieren, wohingegen in anderen Gebieten des Gehirns atrophische Astrozyten auftreten, die verantwortlich für die frühen Veränderungen in synaptischer Plastizität sein könnten[23]. Amyloid- β Peptide werden offenbar bevorzugt von Astrozyten internalisiert und astrozytäre Hypertrophie führt zum Abbau von Amyloid-haltigen Plaques. Der genaue Erkennungs- und Abbaumechanismus ist unklar. Die Astrozyten zeigen außerdem protektive Effekte, indem sie aktivierte Mikroglia inhibieren. Außerdem werden Astrozyten durch die Amyloid- β bedingte Aktivierung zur Produktion von inflammatorischen Mediatoren (IL-1 β , TNF- α) angeregt, die Schäden an Neuronen verursachen können[24].

Die Mikroglia ist ein Gehirn-spezifischer Zelltyp, der dem Dottersack entstammt und während der Embryogenese in das zentrale Nervensystem einwandert, wo sie als endogenes Immunsystem fungiert und eine wichtige Rolle in der Neurogenese und der Synapseninteraktion sowie in der Bewerkstelligung des neuronalen Todes spielt[25]. Ihre Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung wird kontrovers diskutiert, da ihr sowohl eine neuroprotektive als auch eine neurotoxische Rolle zugesprochen wird. Speziell unter dem Aspekt der Amyloid-Kaskade-Theorie nimmt man an, dass Amyloid- β -Ablagerungen eine chronische Entzündung hervorrufen und so eine lang anhaltende Aktivierung der Mikroglia triggern, wobei es zur Produktion von neurotoxischen

Substanzen kommt, die zur Neurodegeneration beitragen. Der Nachweis dystropher Mikrogliazellen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten eröffnet jedoch auch eine andere Perspektive, die besagt, dass Neurodegeneration eine sekundäre Erscheinung ist, die durch seneszente Mikroglia und dem damit einhergehenden Verlust der neuroprotektiven Fähigkeiten ausgelöst wird[26].

Proliferation und Aktivierung von Mikroglia wird in den meisten neurologischen/neuropsychiatrischen Erkrankungen beobachtet, so dass über Therapieansätze in diesem Bereich immer mehr nachgedacht wird. Da die primäre Aufgabe der Mikroglia die Abwehrreaktion gegen Fremdkörper ist, besitzen diese Zellen Oberflächenrezeptoren, die Pathogene erkennen können. Die Aktivierung dieser Rezeptoren bewirkt die Verwandlung der sog. „ruhenden“ Mikroglia in eine aktivierte Form, die durch ihre Beteiligung an der Produktion freier Radikale, Zytokine, Chemokine sich als sehr wirksam bei der Beseitigung der Pathogene darstellt. Diese Prozesse können sich allerdings nachteilig auf den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen auswirken. Im gesunden ZNS räumt die Mikroglia einzelne Zellreste ab, ohne ihren verzweigten Phänotyp zu verlieren[27].

Bei ausgedehnten Schädigungen des Hirngewebes, die zum Tod von Neuronen, Entmarkungen oder Blutungen führen, werden sogenannte Schädigungs-assoziierte Moleküle freigesetzt. Diese führen zur morphologischen Transformation der Mikroglia und zu Veränderungen in der Genexpression. Somit verschiebt sich bei einer Schädigung des ZNS die Balance zwischen den konstitutiv vom gesunden Gehirn generierten Signalen und den „on“-Signalen zu Gunsten der letzteren. Viele dieser Signale werden von den Nervenzellen gesteuert, unter anderen das (C-X3-C motif) ligand 1 protein (CX3CL1). Der Signalweg vom neuronalen CX3CL1 (auch als fractalkine bekannt) zu seinem Mikroglia-rezeptor CX3CR1 ist ein gut charakterisiertes Beispiel der Nervenzellen-Mikroglia-Kommunikation[28].

TREM2 (triggering receptors expressed by myeloid cells 2) wurde kürzlich auf die Liste der Gene, die eine Rolle bei der Spätform der Alzheimer-Erkrankung spielen, gesetzt[29]. TREM2 ist ein Mikroglia-rezeptor, welcher die Phagozytose

vorantreibt und die Inflammation verzögert, wenn es an einen noch nicht identifizierten Liganden apoptotischer Zellen bindet. Während das Chemokin CX3CL1 der Mikroglia zur Erkennung pathologischer Zustände verhilft, spielt TREM2 offenbar eine wichtige Rolle im Prozess der Phagozytose[30]. Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (kurz: PPARs) sind intrazelluläre Rezeptoren, die über einen physiologischen oder pharmakologischen Liganden aktiviert werden und als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren. Sie gehören zu einer Gruppe von Rezeptoren, die im Zellkern angesiedelt sind. Im menschlichen Organismus konnten bisher drei PPAR-Subtypen (α , β/δ , γ) identifiziert werden[31]. Die Aktivierung von ubiquitär exprimiertem PPAR γ führt zu einer Verbesserung des Glukosestoffwechsels sowie der Insulinsensitivität. Die Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors steigert die Aufnahme freier Fettsäuren und wirkt auf die Differenzierung von Adipozyten und Makrophagen. Darüber hinaus hat die Aktivierung von PPAR γ antiinflammatorische Effekte. Letztlich konnte eine Assoziation zwischen der Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors und einer Reduktion des Arteriosklerose-Risikos gezeigt werden. In den letzten Jahren wurde der Zusammenhang zwischen dem Typ 2-Diabetes und der Alzheimer-Erkrankung intensiv erforscht, da offenbar viele der Alzheimer Patienten gleichzeitig an Diabetes erkrankt sind und Letzteres immer mehr als ein Risikofaktor für die Erkrankung an Altersdemenz anerkannt wird[32-34].

1.4 Zielsetzung der Arbeit und Auswahl der zu untersuchenden Hirnregionen und Zelltypen

Basierend auf den aktuellen Theorien zur Pathogenese der AD wurden in dieser Arbeit folgende Ziele definiert: Das erste gilt Einzelzellanalysen zur Quantifizierung von mtDNA Deletionen in Astrozyten und Mikroglia, während das zweite eine Genexpressionsanalyse von Neuroinflammations-assoziierten Genen in Gewebehomogenaten aus verschiedenen Hirnregionen bei Patienten in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung versus Kontrollen umfasst.

Grundlage für die Auswahl der zu untersuchenden Hirnregionen war, wie bereits oben erwähnt, die selektive Vulnerabilität unterschiedlicher Hirnregionen gegenüber Alzheimer-assoziierten Veränderungen: Die Hippokampus-Region gilt laut klassischer Stadieneinteilung[6] als eine der am frühesten befallenen Hirnregionen, während das Kleinhirn weitgehend ausgespart bleibt. Amyloidogene Veränderungen zeigen sich, wenn auch mit einer viel geringeren Ausprägung als im Isokortex, vor allem in der Molekularschicht des Kleinhirns, wohingegen neurofibrilläre Ablagerungen nicht zu finden sind[35, 36]. Der Hirnstamm ist zwischen dem kaum betroffenen Rückenmark und dem stark betroffenen Großhirn lokalisiert und daher von besonderem Interesse[37]. In der Literatur wird er bezüglich der Beteiligung an der AD kontrovers diskutiert: Einerseits konnte gezeigt werden, dass bereits in den Stadien Braak 0 und I neurofibrilläre Veränderungen im dorsalen Raphekern (DRN) auftreten, noch vor dem transentorhinalen Stadium[38, 39]. Auch konnte abnormal phosphoryliertes Tau (sog. Pretangles) im Coeruleus/Subcoeruleuskomplex in der Brücke, ohne Vorliegen von NFT oder Amyloid- β , in Gehirnen von Individuen unter 30 Jahren nachgewiesen werden. Dieses könnte den Startpunkt des pathologischen Prozesses markieren[12].

Unter der Annahme, dass Kerngebiete des Hirnstamms bereits früh bei AD betroffen sind, wurde eine neue Methode entwickelt, die eine Messung von sog. Vagus-evozierten Potentialen nach elektrischer Stimulation des kutanen Astes des Vagusnervs im äußeren Gehörgang erlaubt. Die sensiblen Fasern des Vagusnervs projizieren unter anderem in das Kerngebiet des Nervus trigeminus. Es stellten sich hierbei eindeutige Unterschiede in Form verlängerter Latenzzeiten bei Patienten mit kognitiven Störungen gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe heraus. Die Methode wurde in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie Würzburg entwickelt und in ersten Studien an Patienten mit Alzheimer-Erkrankung validiert[40].

Aus den oben genannten Gründen haben wir folgende drei Hirnareale mit sehr unterschiedlich ausgeprägter Vulnerabilität für die Untersuchungen ausgewählt:

1. die Hippokampusregion mit hoher Vulnerabilität gegenüber neuropathologischen Alzheimer-assoziierten Veränderungen, 2. das Kleinhirn, das bekanntlich eine der niedrigsten Vulnerabilitäten besitzt und 3. den Nucleus tractus spinalis nervi trigemini aus dem Hirnstamm, mit unklarer/unbekannter Vulnerabilität, als Projektionsort für einen Teil der sensiblen Fasern des Vagusnervs (Ramus auricularis).

Aus diesen Regionen sollten einerseits Astrozyten und Mikrogliazellen getrennt auf die Menge an mtDNA Deletionen untersucht werden, andererseits sollte in Gewebehomogenaten das Expressionsprofil einzelner Neuroinflammations-relevanter Gene (CX3CL1 und TREM2) sowie von PPAR γ analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Kryostat	CM 1950	Leica
Laser-Mikrodissektionsmikroskop	LMD 6000/AS LMD	Leica
Magnetrührer	RCT	IKA
Mikroskop	BH2	Olympus
Minizentrifuge	Sprout	Omnilab
PCR Cycler	Mastercycler	Eppendorf
pH-Meter	inoLab	WTW
Präzisionswaage	PLS 360-3	KERN
Real Time PCR System iCycler	iQ	BioRad
Real Time PCR System CFX383 TM	C 1000 TM	BioRad
Spectrophotometer	Nanodrop 1000	Peqlab
Sterilbank	antair	BSK
Thermoblock	TDB-120	Hartenstein
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf
Vortexmischer	L24	Hartenstein
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus

2.2 Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
CFX Manager	3.0	BioRad
LinReg	12.7.0.0	Freie Software
GeNorm	3.5	Freie Software
iQ5	2.0	BioRad

iCycleriQ	3.1	BioRad
Laser Mikrodisektion	6.7.2.4295	Leica Microsystems
Excel	2003; 2007	Microsoft
StatView	5.0	SAS Institute Inc.
2100 Expert	B02.08	Agilent Technologies

2.3 Antikörper

Bezeichnung	Klon	Hersteller	Art. Nr.
CD68, monoclonal mouse anti-human	EBM11	DAKO	M0718
GFAP, monoclonal mouse anti-human	6F2	DAKO	M0761

2.4 Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Hersteller
ND1 Primer Fwd	CCC TAA AAC CCG CCA CAT CT	Eurofins MWG Operon
ND1 Primer Rev	GAG CGA TGG TGA GAG CTA AGG T	Eurofins MWG Operon
ND4 Primer Fwd	CCA TTC TCC TCC TAT CCC TCA AC	Eurofins MWG Operon
ND4 Primer Rev	CAC AAT CTG ATG TTT TGG TTA AAC TAT ATT T	Eurofins MWG Operon

2.5 Sonden

Name	Sequenz (5'→3')	Markierung	Hersteller
ND1 Sonde	CCA TCA CCC ACA TCA CCG CCC	5'FAM	Eurofins MWG Operon
ND4 Sonde	CCG ACA TCA TTA CCG GGT TTT CCT CTT G	5'VIC	Life Technologies

2.6 TaqMan® Gene Expression Assays

Name	Bezeichnung	Markierung	Hersteller
GAPDH	Hs99999905_m1	5'FAM	Life Technologies
TM2D1	Hs00608855_m1	5'FAM	Life Technologies
SLC1A3	Hs00188193_m1	5'FAM	Life Technologies
CX3CL1	Hs00171086_m1	5'FAM	Life Technologies
TREM2	Hs00219132_m1	5'FAM	Life Technologies
PPARγ	Hs01115513_m1	5'FAM	Life Technologies

2.7 Kits

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
AllPrep DNA/RNA Micro Kit	Qiagen	80284
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies	4368814
HistoGreen, HRP-Substrate-Kit	Linaris	E109
Qlamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen	51104

2.8 Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
0,1 % BSA, Blockpuffer	Eigene Herstellung	
0,1 % DEPC H ₂ O	Eigene Herstellung	
1 % Kresylviolett in 100 % EtOH	Eigene Herstellung	
10x PBS pH 7,4	Eigene Herstellung	
Aceton	VWR	20066.467
β-Mercaptoethanol	ROTH	4227.1
DEPC	ROTH	K028.2
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck	6586.0500
Ethanol absolut	Sigma Aldrich	700941
Kaliumchlorid	ROTH	6781
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	4873.1000
Kresylviolett (Acetat)	Merck	4873.1000
MilliQ [®] -H ₂ O	Millipore	
Natriumchlorid	ROTH	9265.1
Natronlauge 2M	Applichem	A2518.1000
Polymer, Envision+	DAKO	K4001
RNase freies Wasser	Qiagen	129112
RNase Inhibitor (20U/μl)	Life Technologies	N8080119
Roti [®] -Histokitt	ROTH	6638.2
Salzsäure 2M	Applichem	A2533.1000
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	Life Technologies	4369016
Terralin [®] liquid	Schülke	23184-A
Tissue-Tek [®]	Sakura	1104800011
Xylol	SAV	

2.9 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
0,2 ml Tubes	Hartenstein	R02
1,5 ml Tubes	Eppendorf	0030 120.086
2,0 ml Tubes	Eppendorf	0030 120.094
15 ml Falcons	Greiner bio-one	188271
30 ml Falcons	Greiner bio-one	210270

96 Well PCR-Platte, farblos	Biozym	710884
384-Hard-Shell [®] -PCR Platte	BioRad	HSP3805
Adhesive Seal Applicator	Life Technologies	4333183
Aufbewahrungsboxen	Hartenstein	
Combitips advanced [®] 0,2 ml	Eppendorf	0030 089.626
Deckgläser für Objektträger 24x60mm	Langenbrick	01-2432/1
Einwegklingen Typ 819	Leica	14035838925
Framesupport für POL Frame Slide	Leica	11532325
Glasobjektträger	Langenbrick	03-0038
Klebefolie, optisch klar	Biozym	600238
Touch N Tuff Handschuhe, nitril	Ansell	92600
POL Frame Slide, Stahlrahmen	Leica	11505188
Multistep Pipette, Multipette [®] plus	Eppendorf	4981 000.019
8-Kanal-Pipette, 0,5-10 µl	Eppendorf	3122 000.019
12-Kanal-Pipette, 10-100 µl	Eppendorf	3122 000.043
Pipetten (verschiedene 1-Kanal)	Eppendorf	
Pipettenspitzen Dualfilter 10 µl	Eppendorf	0030 077.512
Pipettenspitzen Dualfilter 100 µl	Eppendorf	0030 077.547
Pipettenspitzen Dualfilter 1000 µl	Eppendorf	0030 077.571

2.10 Humanes Blut, Muskelgewebe mit Kearns-Sayre-Syndrom (KSS)

Das Vollblut stammte aus der freiwilligen Spende einer 28-jährigen, gesunden, weiblichen Person. Es wurde direkt in EDTA beschichtete Röhrchen abgenommen und weiter aufgearbeitet (siehe 2.18).

Das Muskelgewebe wurde einem an dem KSS erkrankten Patienten post-mortem, nach vorheriger Einwilligung zur Sektion, entnommen. Es wurde kryoasserviert und später aufgearbeitet (siehe 2.18).

2.11 Humanes Gehirngewebe

Gruppe	Fall	Alter	PMI	Geschlecht	Braak	CERAD	RIN
Kontrolle	K01	80	23	m	I	0	6,4
Kontrolle	K02	70	40	w	I	0	6,8
Kontrolle	K03	62	48	w	I	0	6,3
Kontrolle	K04	67	15	m	I	0	6,9
Kontrolle	K05	64	9	m	I	0	6,1
Kontrolle	K06	68	11	m	I	0	5,8
Kontrolle	K07	70	2	m	I	A	7,6
Kontrolle	K08	73	16	w	I	0	5,6
Kontrolle	K09	69	72	m	0	0	6,7
Kontrolle	K10	69	48	m	I	B	5,0

Kontrolle	K11	51	13	w	I	0	5,3
Kontrolle	K12	71	24	w	0	k.A.	5,9
Kontrolle	K13	85	21	m	0	0	7,1
Kontrolle	K14	66	19	m	0	0	6,6
Interm.AD	M01	77	24	w	III	B	6,3
Interm.AD	M02	78	38	w	IV	0	6,6
Interm.AD	M03	75	20	w	III	B	6,5
Interm.AD	M04	85	46	w	III	A	5,9
Interm.AD	M05	64	24	m	III	0	6,6
Interm.AD	M06	86	61	w	III	B	5,4
Interm.AD	M07	80	60	m	III	B	6,2
Interm.AD	M08	92	20	w	III	k.A.	5,1
Interm.AD	M09	86	63	m	IV	k.A.	5,3
Interm.AD	M10	85	25	m	IV	k.A.	5,6
Interm.AD	M11	76	6	m	III	B	5,8
Interm.AD	M12	77	28	w	III	k.A.	5,1
Interm.AD	M13	62	24	m	III	0	8,0
Interm.AD	M14	84	60	w	IV	k.A.	6,2
Fortg.AD	A01	74	26	w	V	C	5,1
Fortg.AD	A02	65	24	w	V	C	5,1
Fortg.AD	A03	80	24	w	VI	C	6,8
Fortg.AD	A04	83	22	w	VI	C	6,0
Fortg.AD	A05	70	39	m	VI	k.A.	5,2
Fortg.AD	A06	62	k.A.	m	VI	k.A.	6,5
Fortg.AD	A07	86	21	w	VI	C	7,2
Fortg.AD	A08	56	7	w	VI	C	5,1
Fortg.AD	A09	74	50	m	VI	k.A.	2,9
Fortg.AD	A10	88	40	w	VI	k.A.	5,1
Fortg.AD	A11	95	13	w	VI	k.A.	5,6
Fortg.AD	A12	63	20	w	VI	B	6,1
Fortg.AD	A13	63	24	m	V	k.A.	6,8
Fortg.AD	A14	63	20	m	VI	k.A.	5,1
Fortg.AD	A15	83	48	m	VI	k.A.	6,0
Fortg.AD	A16	83	38	m	VI	k.A.	5,3

Interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; Fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz; PMI = post mortem Intervall; k.A. = keine Angabe; w = weiblich; m = männlich; CERAD = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease; RIN = RNA Integrity Number

Das humane Gehirngewebe stammte aus den Brain Bank Centers (BBC) Würzburg, München, King's College London und Barcelona. Aus der Gewebekbank der Neuropathologie der Universität Würzburg wurden 23 Fälle verwendet, aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU

München stammten 6 Fälle, aus dem Institut für Psychiatrie, Psychologie und Neurowissenschaften des King's College London waren es 7 Fälle und das Institut für Neuropathologie des Hospital de Bellvitge der Universität Barcelona trug 8 Fälle zu der Studie bei. Alle sind Mitglieder des BrainNet Europe (BNE), welche nach standardisierten Richtlinien arbeiten. Nach Zustimmung der Spender zu Lebzeiten oder mit Zustimmung der nächsten Angehörigen wurde das Gehirn im Rahmen einer Sektion entnommen. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Ethikvotum 99/11).

Für die Untersuchung der mtDNA-Deletionen und der Genexpression wurde auf das kryoasservierte Hirngewebe zurückgegriffen. Die Genexpressionsanalyse wurde mit allen in Tabelle 2.11 gelisteten Fällen bis auf A09 durchgeführt. Die Laser-Mikrodissektion für die Untersuchung der mtDNA-Deletionen wurde an Kontrollfall K01 bis K10, an Fall M01 bis M13 der intermediären Gruppe und an Fall A01 bis A09 der Gruppe mit fortgeschrittener Alzheimer Demenz durchgeführt.

2.12 Zuschneiden von Gehirngewebe

Zur Asservierung der Gewebeproben wurde das Gehirn im ersten Schritt in der sagittalen Ebene halbiert. Eine Hälfte des Großhirnes wurde koronar, die des Kleinhirnes sagittal und der halbe Hirnstamm axial in ca. 1 cm dicke Scheiben zerlegt. Diese wurden zwischen Trockeneis schockgefroren (Quick-freezing Methode) und bei -80 °C gelagert. Die kontralaterale Hirnhälfte wurde für 10-14 Tage in 4 % PBS gepuffertem Formalin fixiert und für spätere immunhistochemische Untersuchung zur neuropathologischen Begutachtung verwendet. Aus den kryofixierten Scheiben wurden die zu untersuchenden Regionen der Kleinhirnrinde und des Hippokampus nach makroskopischer Lokalisation herausgesägt, um die Proben zur Anfertigung von Gewebsschnitten im Kryostaten verwenden zu können. Bei den Hirnstämmen konnte auf Grund ihrer Größe auf weiteres Zuschneiden verzichtet werden.

2.13 Anfertigen von Gewebeschnitten für die Laser-Mikrodissektion

Das Anfertigen der Gewebeschnitte für die Laser-Mikrodissektion wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Bei einer Kammertemperatur von -15 °C und einer Objekttemperatur von -20 °C wurden vom jeweiligen Gewebe 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Hierfür wurde der bei -80 °C gelagerte Gewebekblock mit der gewünschten Region auf Trockeneis transportiert, mittels Tissue-Tek[®] auf einem Probenteller fixiert und für 15 min in der Objektkühlung belassen, um eine Akklimatisierung des Gewebes an die wärmere Umgebungstemperatur zu gewährleisten. Dieses Verfahren diente der Vermeidung von Gefrierartefakten. Die Proben wurden angeschnitten, bis die Region makroskopisch eindeutig zu identifizieren war. Es wurden von jeder Region zwei bis vier 10 µm dicke Sektionen angefertigt und mittels der Aufziehhilfe (Frame Support) auf die Leica POL Membran aufgezogen. Bis zur Durchführung des jeweiligen Färbeprotokolls wurden die aufgezogenen Gefrierschnitte bei -20 °C im Kryostaten aufbewahrt.

2.14 Immunhistochemie

Für die Identifizierung von Astrozyten und Mikroglia wurden Antikörper-basierte Färbemethoden verwendet. Der CD68 (engl. Cluster of Differentiation 68) Antikörper richtet sich nach typischen Strukturen der Mikroglia. Die Astrozyten wurden mittels eines Antikörpers gegen das für sie charakteristische saure Gliafaserprotein (GFAP von engl. Glial fibrillary acidic protein) markiert.

Ansetzen von Lösungen für die Immunhistochemie

- 0,1 % DEPC-Wasser: 1 ml DEPC in 1l MilliQ-Wasser geben und für mindestens 2 h bei Raumtemperatur bis zur Autoklavierung belassen
- 10x PBS:
 - 80 g NaCl
 - 2 g KCl
 - 18 g Na₂HPO₄
 - 2,4 g KH₂PO₄

- | | |
|------------------------|---|
| | in 900 ml 0,1 % DEPC-Wasser lösen, pH mit NaOH (2M) auf 7,4 einstellen und auf 1l auffüllen |
| ➤ 1x PBS | 100 ml 10x PBS auf 1l 0,1 % DEPC-Wasser auffüllen und mit HCL (2M) auf pH 7,4 einstellen |
| ➤ 0,1 % BSA | 0,025 g BSA in 25 ml 1x PBS lösen |
| ➤ HistoGreen Substrat: | 2 Tropfen HistoGreen Substrat und 2 Tropfen H ₂ O ₂ in 1 ml HistoGreen Puffer geben |

2.14.1 CD68 Färbung

Für die Identifizierung der Mikroglia wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Glykoprotein CD68 gearbeitet. Eine Unterscheidung zwischen ruhender und aktivierter Mikroglia ist mit diesem Antikörper nicht möglich.

Die auf die Membranen aufgezogenen Gefrierschnitte wurden in -20 °C kaltem Aceton für 5 min fixiert und anschließend für 5 min luftgetrocknet. Für die Färbung wurde eine Feuchtekammer bereitgestellt, indem ein mit 1x PBS getränkter Papierstreifen am oberen Rand der Färbekammer fixiert wurde. Während der Inkubationszeiten wurde die Färbekammer mit einer weiteren Platte abgedeckt, um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden. Die POL Membran wurde mit dem Schnitt nach oben in die Färbekammer gelegt. Für ein optimales Färbeergebnis wurde der primäre Antikörper CD68 im Verhältnis 1:25 mit 0,1 % BSA verdünnt. Dieses diente hierbei als Blockpuffer, um unspezifische Bindestellen abzudecken. Pro Membran wurden 300 µl des verdünnten Antikörpers gleichmäßig auf die Schnitte pipettiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Primärantikörper durch zweimaliges Waschen in 1x PBS entfernt. Nach dem Waschen wurden 4-6 Tropfen des Envision+ System-HRP (Horse Radish Peroxidase) Polymers auf die Schnitte gebracht. Das Polymer besteht aus sekundären Antikörpern an einem Dextranrückgrat, an welches mehrere Peroxidase Enzyme gekoppelt

sind. Dadurch wurde eine Verstärkung des Färbeergebnisses erreicht. Das Envision+ System beruht auf einer Zwei-Schritt-Methode. Abb.3 zeigt diese Methode schematisch.

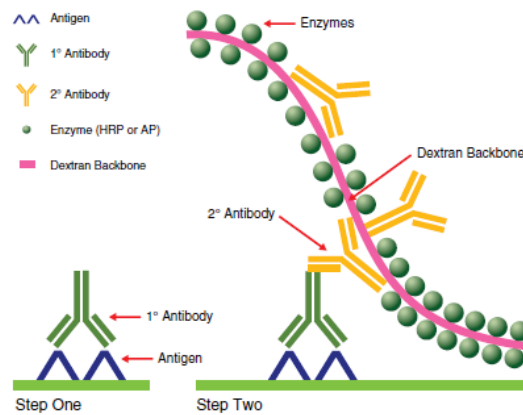


Figure 4. Two-Step Polymer Method (EnVision™).

Abbildung 3: Darstellung der Zwei-Schritt-Polymer Methode, Quelle: DAKO, mit freundlicher Genehmigung.

Der erste Schritt stellt die Antigen-Primärantikörper-Bindung dar. Im zweiten Schritt findet eine spezifische Kopplung vom Sekundärantikörper des Polymers an den Primärantikörper statt. Die am Polymer gebundene Peroxidase vermittelt nach Zugabe von Chromogen und H_2O_2 die Farbgebung.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min folgte das zweimalige Waschen in 1x PBS. Auf die Schnitte wurden 300 μ l HistoGreen Substrat appliziert und für 5 min inkubiert. HistoGreen ist ein Chromogen, welches verbunden mit der Peroxidase des Polymers ein grünes Reaktionsprodukt ergibt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal in 1x PBS und zuletzt in 0,1 % DEPC-Wasser gewaschen. Das 0,1 % DEPC-Wasser führt über Proteinmodifikation zur Hemmung von RNasen und DNasen. Zuletzt folgte der Trockenprozess. Die Membranen wurden zunächst 5 min an der Luft und danach mindestens 45 min im Exsikkator getrocknet.

2.14.2 GFAP Färbung

Zur Darstellung von Astrozyten in den zu untersuchenden Regionen wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der sich gegen das saure Gliafaserprotein richtet.

Die immunhistochemische Färbung der Astrozyten wurde grundsätzlich nach dem Färbeprotokoll zur Identifizierung von Mikroglia durchgeführt. Es unterschied sich jedoch in der Verdünnung des primären Antikörpers sowie in der Inkubationszeit. Die auf die Membranen aufgezogenen Schnitte wurden in -20 °C kühlem Aceton für 5 min fixiert und im Anschluss für 5 min an der Luft getrocknet. Der primäre Antikörper GFAP wurde 1:5 in 0,1 BSA verdünnt. Je Membran wurden 300 µl des Antikörpers auf die Schnitte pipettiert und für 10 min inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen in 1x PBS entfernt. Anschließend wurden 4-6 Tropfen des Envision+ System-HRP Polymers auf die Schnitte gebracht, für 5 min inkubiert und danach zweimal in 1x PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit 300 µl HistoGreen versetzt und für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal in 1x PBS und zuletzt in 0,1 % DEPC-Wasser gewaschen. Die Membranen wurden erst 5 min luftgetrocknet und danach mindestens 45 min im Exsikkator.

2.15 Kresylviolett färbung

Zur besseren Orientierung und zur Identifizierung der gewünschten Lokalisation innerhalb der Schnitte wurde zusätzlich je eine Kresylviolett färbung angefertigt. Der Oxazinfarbstoff bindet an basophile Verbindungen wie RNA und DNA und dient insbesondere der Darstellung von Nervengewebe.

Ansetzen von Lösungen für die Kresylviolett färbung

- 1 % Färbelösung: 1 g Kresylviolett in 100 ml EtOH absolut lösen und filtrieren
- 70 % EtOH: 30 ml EtOH absolut mit 70 ml MilliQ-Wasser mischen

Für die histologische Färbung wurden ein bis zwei 10 µm dicke Kryoschnitte auf einen Glasobjektträger aufgezogen und für 2 min in 70 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Schnitte 1 min in 1 % Kresylviolett Acetat gefärbt. Danach in 70 % und 100 % Ethanol (aufsteigende Alkoholreihe) gewaschen, was zusätzlich der Dehydrierung der Schnitte diente. Nachfolgend wurden sie in Xylol geschwenkt und mit Histokitt eingedeckt.

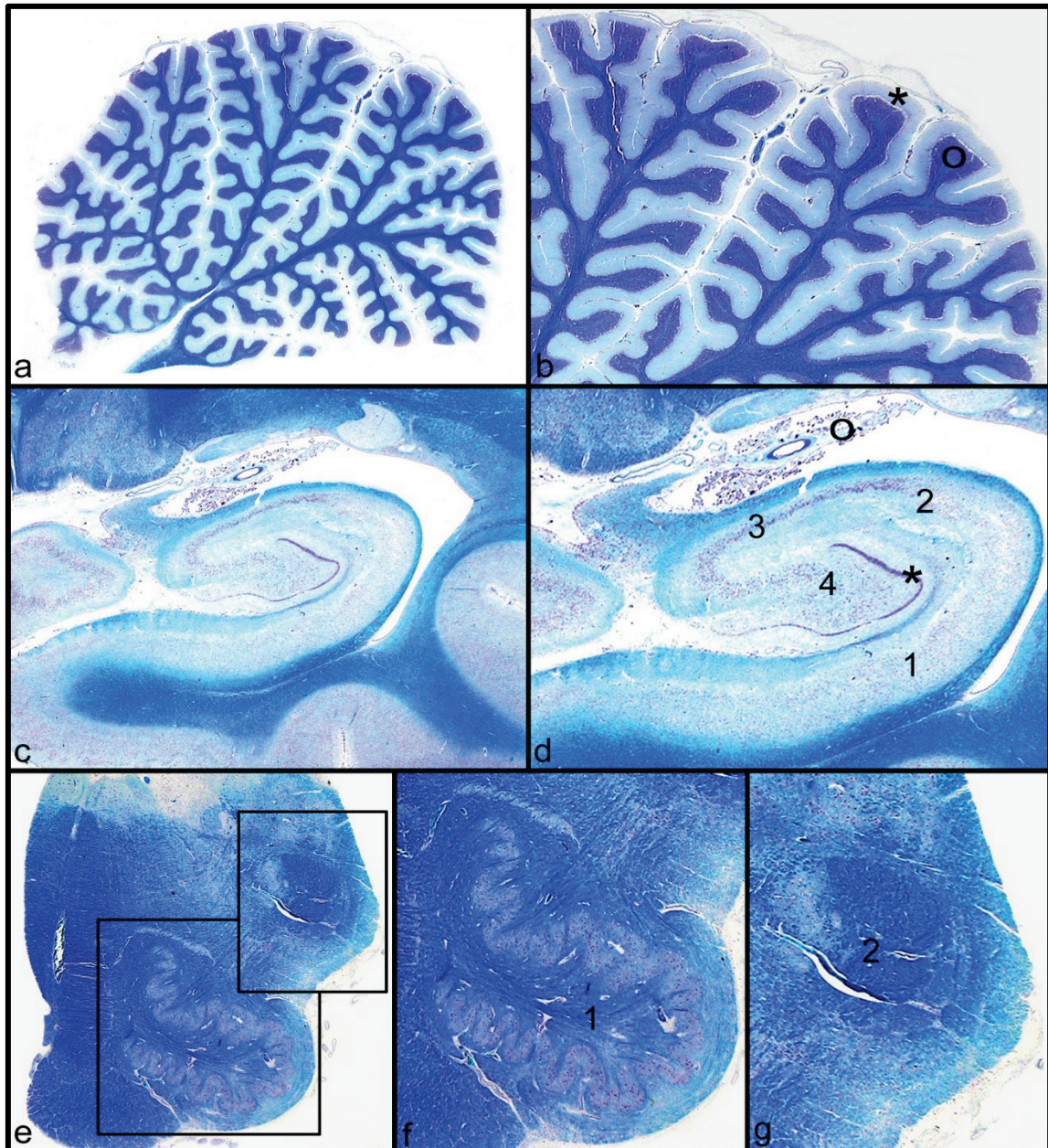


Abbildung 4: Darstellung der untersuchten Regionen.

a: Kleinhirn Teilübersicht; b: * graue Substanz, ° Marklager; c: Hippokampus Übersicht; d: * Gyrus dentatus, 1: CA1, 2: CA2, 3: CA3, 4: CA4, ° Unterhorn des Seitenventrikels; e: Übersicht einer Hälfte des Hirnstamms; f: 1 Olive; g: 2 Nucleus tractus spinalis nervi trigemini

2.16 Laser-Mikrodissektion für die Gewinnung von DNA

Die laserbasierte Mikrodissektion wurde für die gezielte Extraktion einzelner Zellen aus Gewebehomogenaten entwickelt. Eine Vermischung von verschiedenen Zelltypen kann somit weitgehend vermieden werden. Mittels Mikroskop und entsprechender Software konnten die Zellen markiert und mit dem Laserstrahl herausgelöst werden. In dieser Arbeit wurde das Leica System benutzt, bei dem die ausgeschnittenen Proben gemäß der Schwerkraft in den Deckel des darunter positionierten Reaktionsgefäßes fallen.

Für die Laser-Mikrodissektion wurde das Reaktionsgefäß nach Anleitung in den dafür vorgesehenen Halter eingespannt, so dass der Deckel nach oben zeigt. Im Anschluss an die Fokussierung wurde die POL Membran mit dem Gewebe in den dafür vorgesehenen Objektträgerhalter eingespannt. Je nach Zelltyp und Region wurde das 20x bzw. 40x Objektiv gewählt. Die Zellen wurden auf dem Bildschirm, der das Live-Bild des Mikroskops zeigt, mittels der Computermaus umfahren und entlang der Markierungen herausgeschnitten. Die Zellen des Kleinhirns wurden aus dem Marklager disseziert, im Hippokampus aus dem Cornu ammonis (CA) und die Zellen im Hirnstamm aus dem Nucleus tractus spinalis nervi trigemini.

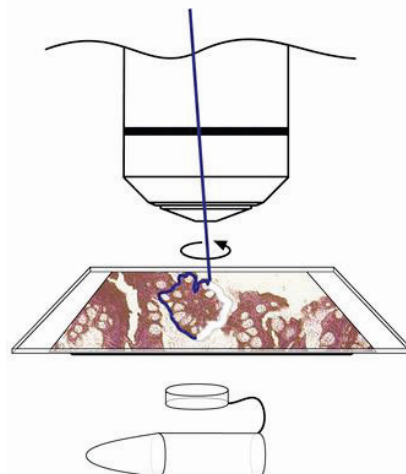


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Laser-Mikrodissektion, Quelle: LEICA, mit freundlicher Genehmigung.

Für die Gewinnung von Astrozyten aus dem Kleinhirn und Hippokampus, sowie von Mikroglia aus dem Kleinhirn wurde das 20x Objektiv mit den nachfolgenden Einstellungen verwendet:

Power	Speed	Specimen balance	Offset
65	6	24	26

Für die Gewinnung von Astrozyten aus dem Hirnstamm und der Mikroglia aus Hippokampus und Hirnstamm wurde das 40x Objektiv unter Verwendung folgender Parameter gewählt:

Power	Speed	Specimen balance	Offset
49	5	7	40

Dabei gibt der Parameter "Power" den Wert für die Kraft des Laserstrahls an, "Speed" stellt den Wert für die Abstände der einzelnen Laserpunkte dar und "Specimen balance" definiert die Stärke des Laserstrahls zum Ende der Dissektion hin. Ein spezifischer Wert für jedes Objektiv ist das sogenannte "Offset". Es reguliert den Fokus auf die Objektebene.

Für die Aufbewahrung der Zellen wurde ein Lysepuffer hergestellt. Dazu wurden 1 ml Puffer RLT aus dem AllPrep™ DNA/RNA Micro Kit mit 10 µl β-ME versetzt. Nach der Dissektion von 150 Zellen des gewünschten Typs und der ausgewählten Region wurden 5 µl in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert und dieses sehr vorsichtig aus dem Halter entnommen. Nachfolgend wurden weitere 65 µl Puffer RLT + β-ME zugegeben, das Gefäß verschlossen, durch Schnipsen suspendiert und auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert, in 285 µl Puffer RLT + β-ME überführt und für 30 sec mit dem Vortexmischer gemischt. Im Anschluss wurden die Zellen im Lysepuffer bei -80°C bis zur DNA-Isolierung aufbewahrt.

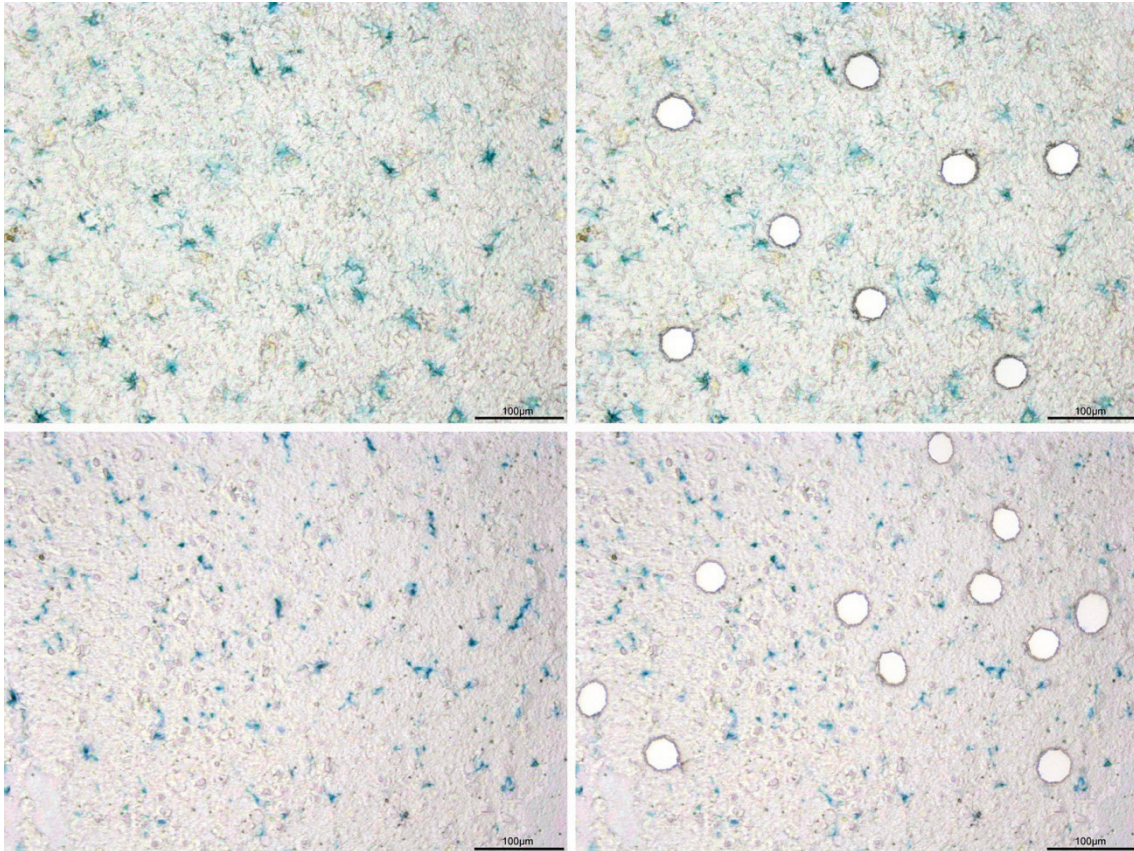


Abbildung 6: Darstellung der GFAP-Färbung (oben) und der CD68-Färbung (unten) vor und nach der Laser-Mikrodissektion.

2.17 DNA-Isolierung aus mikrodissenzierten Zellen

Die DNA-Isolation erfolgte nach dem Protokoll des AllPrep™ DNA/RNA Micro Kits von Qiagen. Mit diesem Kit können Nukleinsäuren vor allem aus wenig Material extrahiert werden. Nach mehreren Zentrifugations- und Waschschritten mit verschiedenen Lösungen wurde die DNA in zwei Schritten mit jeweils 30 µl EB-Puffer eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.18 DNA-Isolierung aus Vollblut und Muskelgewebe (KSS)

Die DNA-Isolierung aus Vollblut einer jungen, gesunden, weiblichen Erwachsenen erfolgte nach dem Qlamp DNA Micro Kit von Qiagen. Die gewonnene DNA wurde in nachfolgender duplex qPCR als Kalibrator für die einzelnen Proben einer Platte, sowie als Inter-Run-Kalibrator zur Bestimmung der mtDNA-Deletionen eingesetzt.

Die DNA-Isolation aus dem Muskelgewebe wurde nach dem Protokoll des AllPrep™ DNA/RNA Micro Kits durchgeführt und diente ebenfalls als Kalibrator.

2.19 Quantitative Real-Time-PCR mtDNA-Deletionen

Zum Vergleich der Deletionsanteile der mitochondrialen DNA in den drei Gruppen und Gehirnregionen wurde eine duplex quantitative PCR (qPCR) durchgeführt[18, 41]. Mit der qPCR kann man Nukleinsäuren nicht nur vervielfältigen wie bei der herkömmlichen PCR, sondern auch die Menge der Nukleinsäuren im Reaktionsansatz bestimmen. Dies geschieht, indem der Vervielfältigungsprozess der eingesetzten DNA-Probe durch Fluoreszenzemission in Echtzeit detektiert und aufgezeichnet wird. Die Darstellung des Amplifikationsprozesses mittels Fluoreszenz erfolgte mittels Hydrolyse-Sonden, sogenannten TaqMan-Sonden. Diese bestehen im Allgemeinen aus einer festen Nukleotidsequenz, an deren 5'-Ende ein Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende ein nicht fluoreszierendes Quencher-Molekül angebracht ist. Das Abstrahlen von Fluoreszenz des Reporters wird, solange die Sonde intakt ist, durch die räumliche Nähe zum Quencher-Molekül aufgrund des sogenannten Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) verdrängt. Während jedes Amplifikationszyklusses spaltet die Taq-DNA-Polymerase durch ihre 5'-3'-Nukleaseaktivität die Sonde von der Zielsequenz ab. Dadurch werden Reporter und Quencher voneinander getrennt, der FRET-Effekt wird aufgehoben und der Reporter-Farbstoff emittiert seine Fluoreszenz. Nach der Sondenentfernung folgt die abschließende Verlängerung der gewünschten Sequenz. Mit jeder Amplifikation erhöht sich die Zahl der abgespaltenen Reportermoleküle, wodurch sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des produzierten Amplikons erhöht. Je höher die anfängliche Kopienanzahl der Zielsequenz war, desto früher wird eine signifikante Fluoreszenzemission gemessen.

Bei einer multiplex qPCR, in diesem Fall duplex, befinden sich in einem Reaktionsansatz mehrere Primersets und zugehörige Sonden. Da die Mehrheit der Mutationen im ND4-Gen der mitochondrialen DNA liegt und das ND1-Gen weitgehend von Deletionen ausgespart ist, wurden diese beiden Gene

verwendet. Dabei dienten die spezifische Sonde und das Primerset des ND4-Gens der Detektion des Deletionsgrades. Die ND1-spezifische Sonde und Primer fungierten im gleichen Ansatz als interne Kontrolle.

Für die qPCR wurde der TaqMan Gene Expression Mastermix verwendet. Dieser enthält unter anderem die Uracil-DNA-Glykosylase (UNG), ein Enzym, welches uracilhaltige Amplifikate abbaut und dadurch eine kontaminationsarme Verlängerung der gewünschten Nukleotidsequenz gewährleistet.

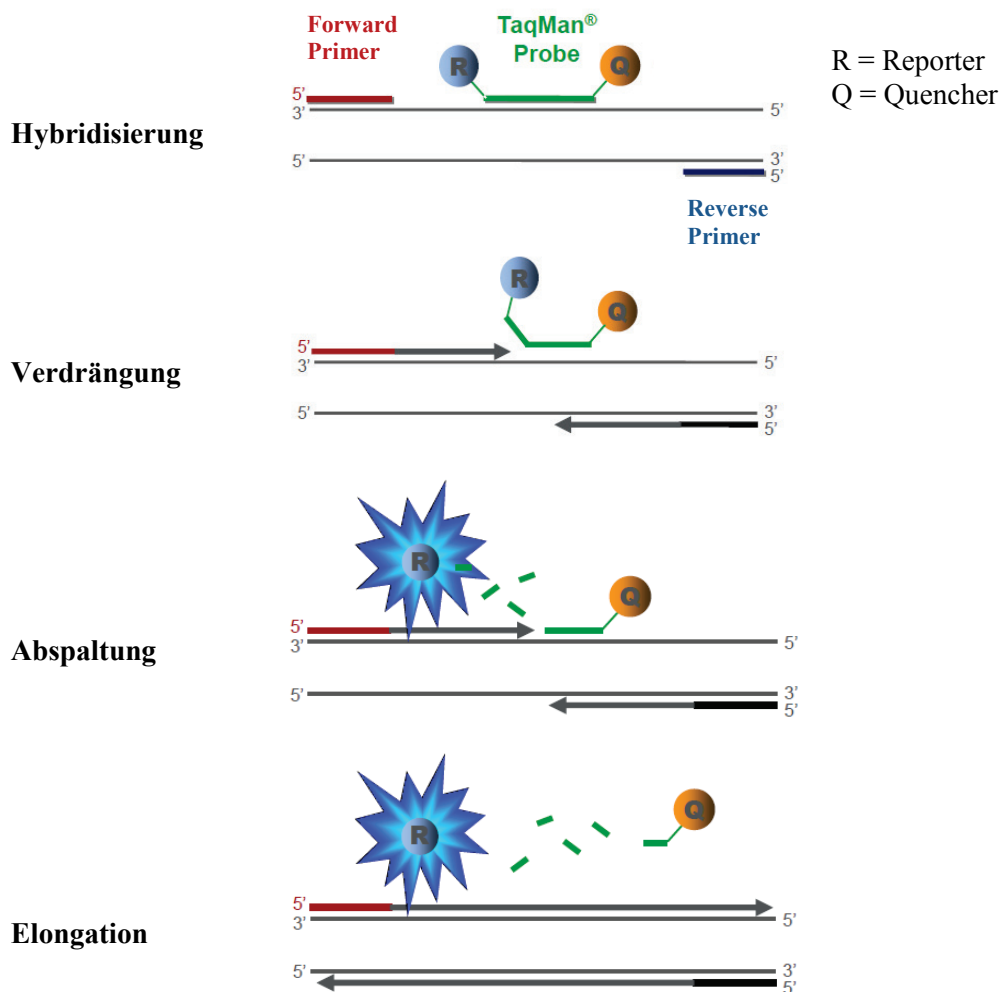


Abbildung 7: Funktionsprinzip einer Hydrolyse-Sonde, Quelle: Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystem), mit freundlicher Genehmigung.

Der Mastermix wurde in einer 12 µl Reaktion verwendet. Die Primer hatten eine Konzentration von 900nM und die Sonden von 250nM. Je Ansatz wurden 2 µl DNA aus der jeweiligen Gehirnregion eines Falles pipettiert. Die Konditionen

des PCR-Laufes bestanden aus einer initialen Phase von 2 min bei 50°C zur Aktivierung der UNG. Die Taq-Polymerase wurde nachfolgend bei 95°C für 10 min aktiviert. Anschließend folgten 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung der DNA für 15 sec bei 95°C und einer anschließenden Elongation für 15 sec bei 60°C. Jede Probe wurde in Triplikaten eingesetzt.

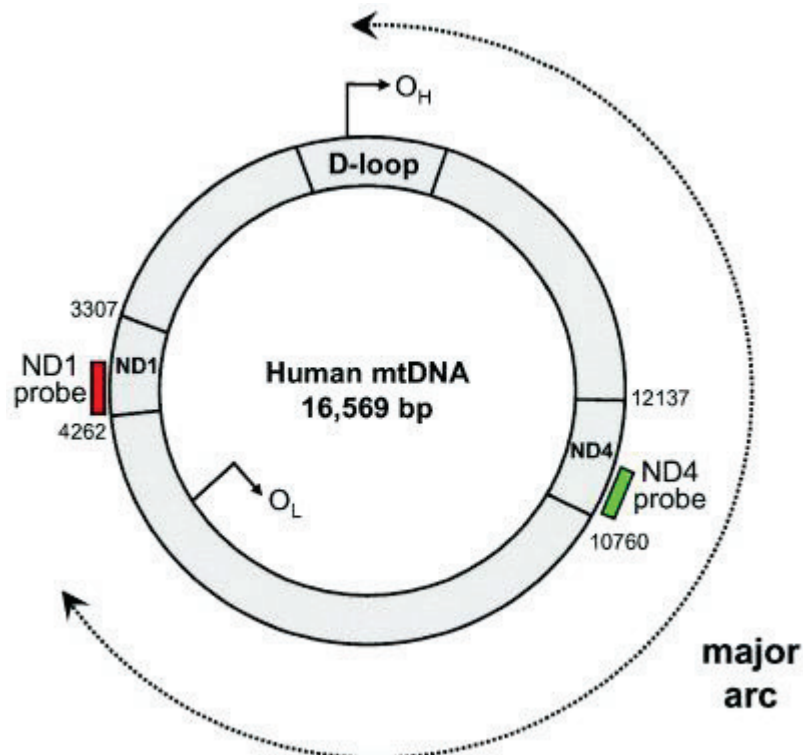


Abbildung 8: Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms. Die ausschließlich maternal vererbte mitochondriale DNA entspricht einem zirkulären DNA-Doppelstrang, der sich in der Matrix von Mitochondrien befindet. Im rot markierten Bereich befindet sich der vom ND1-Primer, im grün markierten Bereich der vom ND4-Primer umspannte DNA-Abschnitt[42], mit freundlicher Genehmigung.

2.20 Auswertung der mtDNA Deletionen

2.20.1 Relative Quantifizierung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem effizienzkorrigierten Modell, einer Weiterentwicklung der $\Delta\Delta$ Cq-Methode[43]. Vorteil dieser Methode ist ein individuelles Verwenden der ermittelten Primereffizienzen (E). Diese wurden mit Hilfe der Software LinReg kalkuliert. Sie berechnet hierfür den Anstieg der Fluoreszenz in der linearen Phase der qPCR und mittelt den Wert aller Kurven, die zu einem Lauf bzw. Primerpaar gehören[44]. Die relative Expression (R) erhält man durch die Formel (1):

$$R = \frac{E_{Target}^{Cq_{Target}(Kalibrator-Probe)}}{E_{Ref}^{Cq_{Ref}(Kalibrator-Probe)}} \quad (1)$$

Bei Bezug auf das Ziel-Gen ND4 und das Referenz-Gen ND1 sowie unter Einbeziehung der mit LinReg ermittelten Primereffizienzen erhält man die Formel (2) für die Astrozyten und die Formel (3) für die Mikroglia:

$$R = \frac{1,783_{ND4}^{Cq_{ND4}(Kalibrator-Probe)}}{1,698_{ND1}^{Cq_{ND1}(Kalibrator-Probe)}} \quad (2)$$

$$R = \frac{1,765_{ND4}^{Cq_{ND4}(Kalibrator-Probe)}}{1,697_{ND1}^{Cq_{ND1}(Kalibrator-Probe)}} \quad (3)$$

Die errechneten Expressionswerte wurden in einem letzten Schritt in prozentuale Werte umgewandelt. Dadurch war eine Beurteilung über die Deletionsanteile möglich (4):

$$Deletion [\%] = 100 - (R * 100) \quad (4)$$

2.20.2 Statistische Auswertung der Daten

Die abschließende statistische Auswertung wurde mit StatView 5.0 durchgeführt. Dazu wurden die Daten der unterschiedlichen Gruppen und Gehirnregionen unter Verwendung des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis und des Post-hoc Mann-Whitney Tests errechnet. Für die Korrelationsanalysen zwischen mtDNA Deletionsanteilen und dem Alter, post mortem-Zeit und Braak-Stadien wurde die Fisher Transformation verwendet. Die demographischen Daten der Fälle wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Post-hoc Scheffé ermittelt. Generell wurden p-Werte unter 0.05 als signifikant erachtet.

2.21 Anfertigen von Gewebeschnitten für die Validierung der Gene

Das Anfertigen der Gewebeschnitte für die Genexpressionsanalyse fand unter RNase-freien Bedingungen statt. Der jeweilige, bei -80°C gelagerte Gewebekblock wurde auf Trockeneis transportiert, um die Kühlkette nicht zu unterbrechen. Anschließend wurde er bei einer Kammertemperatur von -15°C und einer Objekttemperatur von -20°C im Kryostaten mittels Tissue-Tek[®] auf einen Probenteller aufgeblickt. Dann wurde 15 min abgewartet, bis sich das Gewebe an die Umgebungstemperatur angepasst hatte. Nach dem Anschneiden des Gewebekblocks wurden mehrere 10 μm dicke Schnitte angefertigt. Von Kleinhirn und Hippokampus wurden 2-3 Schnitte, von dem Hirnstamm 4-6 Schnitte auf Grund der geringeren Größe verwendet. Die Schnitte wurden mit einer kurz in RLT+ β -ME getauchten Präpariernadel aufgenommen und in 1,5 ml Tube mit 350 μl RLT+ β -ME überführt. Anschließend wurden die Ansätze für 30 sec gevortext um das Lysat zu homogenisieren. Bis zur unmittelbar nachfolgenden RNA-Isolation wurden die Ansätze im -20°C kühlen Kryostaten belassen.

2.22 RNA-Isolierung aus Gewebehomogenat

Die Isolierung von RNA erfolgte nach dem Protokoll des RNeasy Micro Kits von Qiagen aus Gewebehomogenaten. Die Gewebeschnitte wurden in 350 μl

Puffer RLT+ β -ME überführt und direkt im Anschluss aufgearbeitet. Auf den DNase-Verdau wurde verzichtet. Nach der Isolierung wurde die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop 1000 gemessen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die RNA wurde für den Zweck der RIN-Bestimmung benötigt oder fungierte nach Umschreibung in cDNA als Template sowie als Inter-Run-Kalibrator.

2.23 Bestimmung der RNA Integrity Number (RIN)

Für die Qualitätskontrolle der RNA wurden 2 μ l RNA an die Microarray Core Unit Würzburg übergeben. Die Proben wurden dort auf einen Chip aufgebracht und im Agilent 2100 Bioanalyzer analysiert. Die Ergebnisse wurden ähnlich einem Gellauf sowie elektrophoretisch dargestellt. Prominente Banden bzw. Peaks stellen bei intakter RNA die 18S und 28S RNA dar.

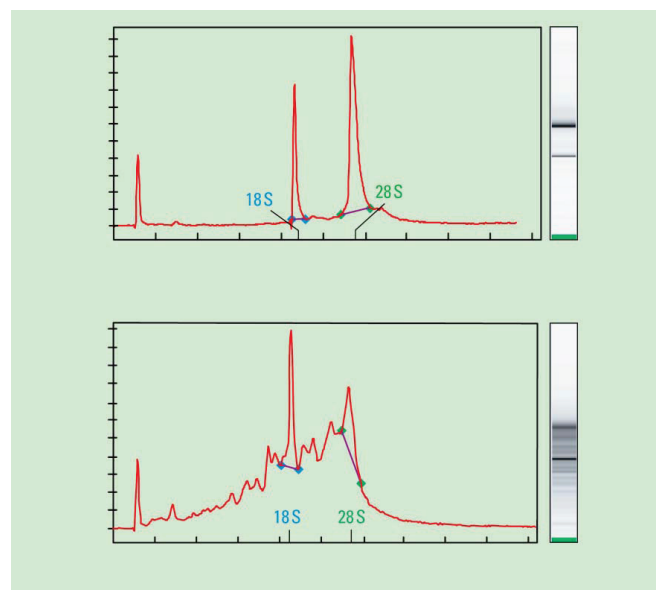


Abbildung 9: Darstellung von RIN Analysen, Quelle: Agilent Technologies, mit freundlicher Genehmigung. Die obere Abbildung zeigt eine intakte, die untere eine partiell degradierte RNA.

Als Maß für die Qualität der RNA wurde die sogenannte RIN ermittelt, wobei ein Wert von 10 für intakte RNA steht und 0 für komplett degradierte RNA[45]. In dieser Studie wurden lediglich Fälle mit einer RIN ≥ 5 verwendet.

2.24 cDNA-Synthese von RNA

Die cDNA Synthese der isolierten RNA erfolgte nach dem Protokoll des High Capacity Kits von Life Technologies. Es wurde der Ansatz mit RNase-Inhibitor (20U/μl) verwendet. Der Ansatz wurde unter der Sterilbank auf Eis pipettiert. Im Anschluss wurde die cDNA zur Validierung der Genexpression und als Inter-Run-Kalibrator eingesetzt.

2.25 Validierung der Gene mittels Real-Time-PCR

Für die Genexpressionsanalyse am Gewebehomogenat wurde eine quantitative PCR durchgeführt. Die TaqMan[®] Gene Expression Assays, die hierfür zum Einsatz kamen, wurden Intron-übergreifend gewählt, um eine Amplifizierung genomischer DNA zu verhindern. Auf den Schritt des DNase-Verdau konnte verzichtet werden, da jeder Assay in einer -RT Kontrolle negativ getestet wurde. Für die Anwendung wurde der TaqMan Gene Expression Mastermix in einem Ansatz von 13 μl verwendet. Je Ansatz wurde 1 μl einer 1:10 verdünnten cDNA der jeweiligen Region eines zu untersuchenden Falles in Triplikaten eingesetzt. Das Thermoprogramm des PCR Laufes bestand aus einer Aktivierung der UNG bei 50°C für 2 min und einer anschließenden Aktivierung der Polymerase bei 95°C für 10 min. Es folgten 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung der cDNA für 15 sec bei 95°C und einer anschließenden Elongation für 15 sec bei 60°C.

2.26 Auswertung der Genexpression

2.26.1 Normalisierung der Daten aus der quantitativen Real-Time-PCR

Um die Daten aus der qPCR akkurat zu normalisieren, wurde mit einem Set aus Referenzgenen gearbeitet [46]. Für die Ermittlung der stabilsten Gene wurden die aus der qPCR gewonnenen C_q-Werte aller Gene zunächst in Quantitäten (Q) umgewandelt (1):

$$Q = E^{\Delta Cq(Cq - Cq_{min})} \quad (1)$$

Die Referenzgene für die Normalisierung wurden mittels GeNorm eruiert. Dafür wurden die Quantitäten in GeNorm eingelesen. Die Software ermittelte die am stabilsten exprimierten Gene (GAPDH, SLC1A3, TM2D1), die im Folgenden zur Normalisierung der Targetgene (CX3CL1, TREM2, PPAR γ) verwendet wurden. Zu diesem Zweck wurde ein sogenannter Normalisierungsfaktor (NF) ermittelt. Dieser fließt in die Berechnung des Expressionslevels (R) ein, indem man die Quantitäten der Zielgene durch den erhaltenen Normalisierungsfaktor dividiert (2):

$$R = \frac{Q_{Zielgen}(2)}{NF}$$

2.26.2 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten unterschiedlicher Gruppen und Gehirnregionen wurde unter Verwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und dem Post-hoc-Scheffé Test durchgeführt. Für Korrelationsanalysen zwischen der Expression eines Zielgens, dem Alter, der post mortem-Zeit, RIN und der Braak-Stadien wurde die Fisher Transformation verwendet. p-Werte unter 0.05 wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Mitochondriale Deletionen

Für die Quantifizierung der Deletionsanteile des ND4 Gens in Astrozyten und Mikroglia wurden 32 Fälle untersucht. Von jedem Zelltyp wurden jeweils 150 Zellen aus dem Marklager des Kleinhirnes, dem Cornu ammonis des Hippokampus sowie aus dem Nucleus tractus spinalis nervi trigemini des Hirnstammes laser-mikrodisseziert.

3.1.1 Demographische Daten

Der Probenumfang der Gruppen belief sich auf 10 Kontrollfälle, 13 Fälle in der Gruppe der intermediären und auf 9 Fälle in der Gruppe der fortgeschrittenen Alzheimer Demenz. Die demographischen Daten der Fälle sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

	Gesamt	Kontrolle Braak 0-I	interm.AD Braak III-IV	fortg.AD Braak V-VI
Geschlecht (m/w)	16/16	7/3	6/7	3/6
Alter (Jahre \pm SD)	74.0 \pm 8.9	69.4 \pm 5.0*	78.7 \pm 8.6*	72.2 \pm 10.0
PMI (Stunden \pm SD)	31.7 \pm 18.4	28.4 \pm 22.5	33.8 \pm 18.3	26.6 \pm 12.8
Braak (Stadium \pm SD)	3.2 \pm 1.9	0.9 \pm 0.3	3.2 \pm 0.4	5.8 \pm 0.4

Tabelle 1: Demographische Daten der untersuchten Fälle.

PMI = post mortem Intervall; interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz; SD = Standardabweichung; w = weiblich; m = männlich. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Post-hoc Scheffé, *p < 0.05 versus Kontrolle, * p< 0.05 versus interm. AD

Die Fälle zeigen einen signifikanten Unterschied ($p = 0.0366$) bezüglich des Alters zwischen der intermediären AD-Gruppe (78.7 \pm 8.6) und der Kontrollgruppe (69.4 \pm 5.0).

3.1.2 mtDNA-Deletionsanteile der Astrozyten

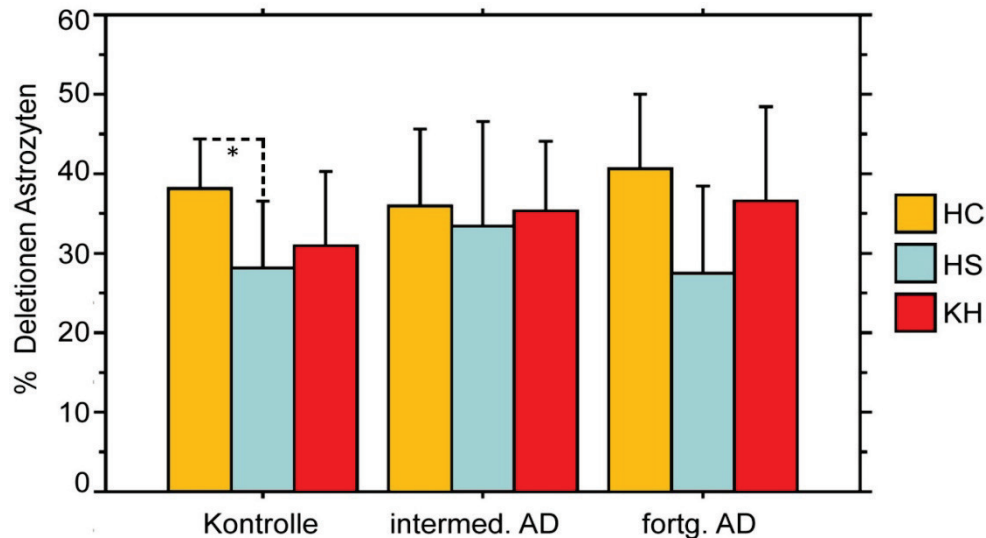


Abbildung 10: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Astrozyten im Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD). Die Balken zeigen die Mittelwerte der mtDNA-Deletionen (%), die Whiskers die Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede (* $p < 0,05$) basieren auf der statistischen Analyse mittels Kruskal-Wallis und Post-hoc Mann-Whitney.

Um die mtDNA-Deletionsanteile der Astrozyten mit der Progression der AD zu korrelieren, wurden die Zellen aus den drei Gehirnregionen, mit verschiedener Vulnerabilität gegenüber AD, laser-mikrodisseziert. Abbildung 10 zeigt die mtDNA Deletionsanteile aller analysierten Regionen.

Die Deletionsgrade in den hippokampalen Astrozyten des Cornu ammonis zeigten eine leichte Abnahme von der Kontrollgruppe (38.0% \pm 6.46) zu der Gruppe der intermediären AD-Fälle (35.86 % \pm 9,01). Es folgte ein Anstieg der Deletionen im Hippokampus in der fortgeschrittenen AD-Gruppe (40.57 % \pm 9.45) ($H(2) = 0.647$, $p = 0.724$). Die Deletionsanteile im Nucleus tractus spinalis nervi trigemini nahmen von der Kontrollgruppe (28.01 % \pm 8.65) zu der intermediären AD-Gruppe zu (33.38 % \pm 13.3). Folglich nahm die Deletionslast in der Gruppe der fortgeschrittenen AD Fälle ab (27.48 % \pm 11.11) ($H(2) = 1.587$, $p = 0.452$). Der mtDNA-Deletionsgrad der Astrozyten im Marklager des Kleinhirnes nahm von der Kontrollgruppe (30.84 % \pm 9.59) zu der intermediären Gruppe zu (35.62 % \pm 8.84) und betrug schließlich 36.45 % \pm 11.97 in der

fortgeschrittenen AD-Gruppe ($H(2) = 0.980$, $p = 0.613$). Es ließen sich signifikante Unterschiede an mtDNA Deletionsgraden innerhalb der Kontrollgruppe zwischen Hippokampus und dem Hirnstamm nachweisen ($U = 17$, $p = 0.0222$, Post-hoc Mann-Whitney).

Betrachtet man die verschiedenen Gehirnregionen ungeachtet der AD Progression, so ergibt sich für die Astrozyten des Cornu ammonis des Hippokampus ein Deletionsgrad von $37.77\% \pm 8.46$. Die Astrozyten des Nucleus tractus spinalis nervi trigemini sind zu $29.88\% \pm 11.3$ deletiert und das Kleinhirn weist einen Deletionsanteil von $34.15\% \pm 10.0$ auf. Die Astrozyten des Hippokampus sind gegenüber denen des Nucleus tractus spinalis nervi trigemini um 7.89% mehr deletiert, was einen signifikant erhöhten Anteil darstellt ($U = 0.0178$, $p = 0.0046$; Post-hoc Mann-Whitney).

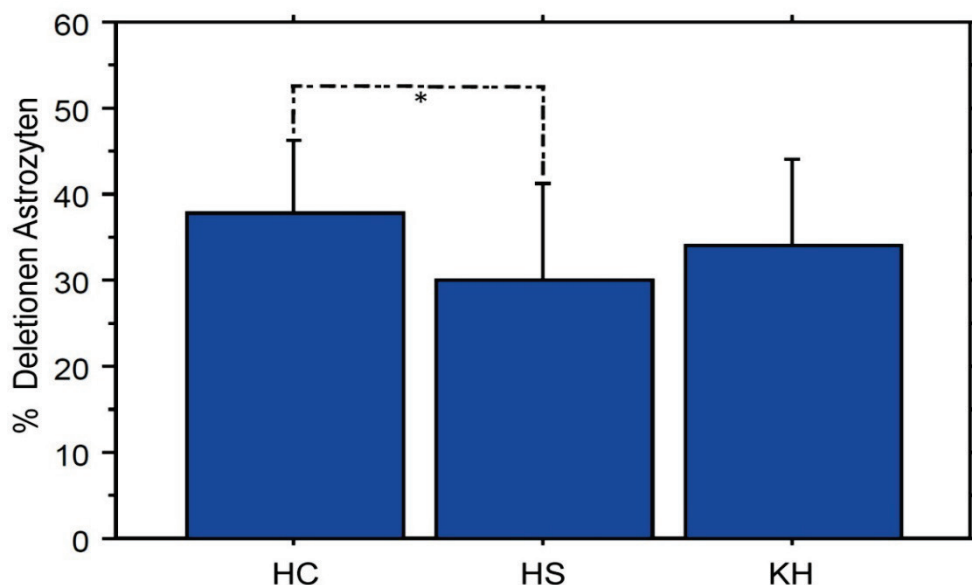


Abbildung 11: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Astrozyten im Hippokampus (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) unabhängig von der AD-Progression. * $p < 0.05$, basierend auf der statistischen Analyse mittels Kruskal-Wallis und Post-hoc Mann-Whitney. Die Balken zeigen die mtDNA-Deletionen (%), die Whiskers die Standardabweichung.

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
HC	37.77 % ± 8.46*	38.0 % ± 6.46°	35.86 % ± 9,01	40.57 % ± 9.45
HS	29.88 % ± 11.3	28.01 % ± 8.65	33.38 % ± 13.3	27.48 % ± 11.11
KH	34.15 % ± 10.0	30.84 % ± 9.59	35.18 % ± 8.84	36.45 % ± 11.97

Tabelle 2: Tabellarische Zusammenfassung mtDNA-Deletionen der Astrozyten. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung; HC = Hippokampus; HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn; interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz; *p < 0.05 versus HS und KH, °p < 0.05 versus HS, Post-hoc Mann-Whitney

Region		Alter	PMI	Braak
HC	Rho	7.724E-5	0.057	0.009
	Korrelation	0.009	0.239	0.096
	<i>p-Wert</i>	0.967	0.242	0.646
HS	Rho	0.014	0,055	1.618E-4
	Korrelation	0.119	-0.234	-0.13
	<i>p-Wert</i>	0.552	0.223	0.948
KH	Rho	0.022	0.001	0.043
	Korrelation	-0.147	0.31	0.208
	<i>p-Wert</i>	0.442	0.870	0.263

Tabelle 3: Korrelationsanalyse der Astrozyten. PMI = post mortem Intervall, HC = Hippokampus, HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn

Die Korrelationsanalyse ergab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Alter, dem PMI, den Braak-Stadien und den Deletionsgraden der Astrozyten in den verschiedenen Gehirnregionen.

3.1.3 mtDNA-Deletionsanteile der Mikroglia

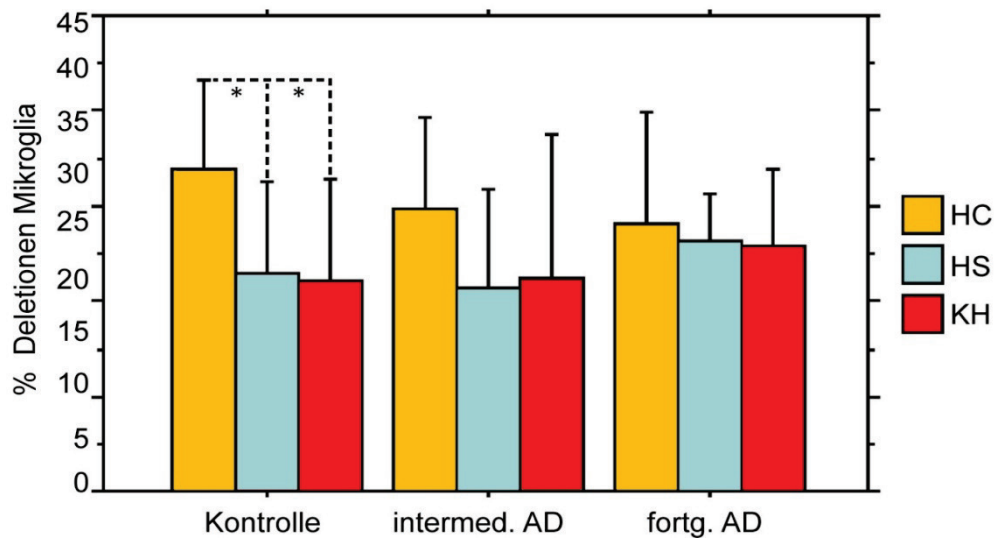


Abbildung 12: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Mikroglia im Hippokampus (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD). Die Balken zeigen die Mittelwerte der mtDNA-Deletionen (%), die Whiskers die Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede (* $p < 0.05$) basieren auf der statistischen Analyse mittels Kruskal-Wallis und Post-hoc Mann-Whitney.

Um die mtDNA-Deletionsanteile der Mikroglia mit der Progression der AD zu korrelieren, wurden die Mikroglia ebenso aus den drei Gehirnregionen, die unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber AD zeigen, laser-mikrodisseziert. Abbildung 12 zeigt die mtDNA-Deletionsgrade der untersuchten Regionen.

Die Deletionsanteile des CA des Hippokampus zeigte eine Abnahme der Deletionen von der Kontrollgruppe (33.98 % \pm 9.22) zu den Fällen der intermediären Gruppe (29.63 % \pm 9.63) und eine weitere Abnahme zu der fortgeschrittenen AD-Gruppe (28.12 % \pm 11.77) ($H(2) = 1.327$, $p = 0.515$). Im Nucleus tractus spinalis nervi trigemini lag der Deletionsgrad der Kontrollgruppe bei 22.87 % \pm 9.65 und zeigte eine Abnahme gegenüber den Fällen der intermediären AD-Gruppe (21.23 % \pm 10.56). In der Gruppe der fortgeschrittenen AD-Fälle (26.39 % \pm 4.87) stieg die Deletionslast um 5.16 % im Vergleich zu der intermediären AD-Gruppe an ($H(2) = 0.357$, $p = 0.837$). Die Deletionsrate der Mikroglia im Marklager des Kleinhirnes lag in der

Kontrollgruppe bei 22.01 % \pm 10.83, in der intermediären Gruppe bei 22.33 % \pm 15.28 und in der fortgeschrittenen AD-Gruppe bei 25.89 % \pm 8.09 ($H(2) = 6.513$, $p = 0.0385$). Es ließen sich signifikante Unterschiede an mtDNA Deletionsgraden innerhalb der Kontrollgruppe zwischen Hippokampus und dem Hirnstamm ($U = 14$, $p = 0.0209$) sowie zwischen dem Hippokampus und dem Kleinhirn nachweisen ($U = 14$, $p = 0.0343$, Post-hoc Mann-Whitney).

Vergleicht man die Gehirnregionen unabhängig von der AD-Progression, so belief sich die Deletionslast der Mikroglia des hippocampalen CA auf 30.72 % \pm 9.80. Der Deletionsgrad des Nucleus tractus spinalis nervi trigemini lag bei 22.71 % \pm 9.36 und der des Marklagers im Kleinhirn bei 23.41 % \pm 11.47. Die Mikroglia des hippocampalen CA war gegenüber der des Nucleus tractus spinalis nervi trigemini um 8.01 % mehr deletiert, was einen signifikant erhöhten Anteil darstellte ($U = 161$, $p = 0.0033$; Post-hoc Mann Whitney). Mit einem 7.31 % höheren Deletionsgrad zeigte das CA des Hippokampus auch gegenüber dem Marklager des Kleinhirnes Signifikanz ($U = 203$, $p = 0.0138$; Post-hoc Mann-Whitney).

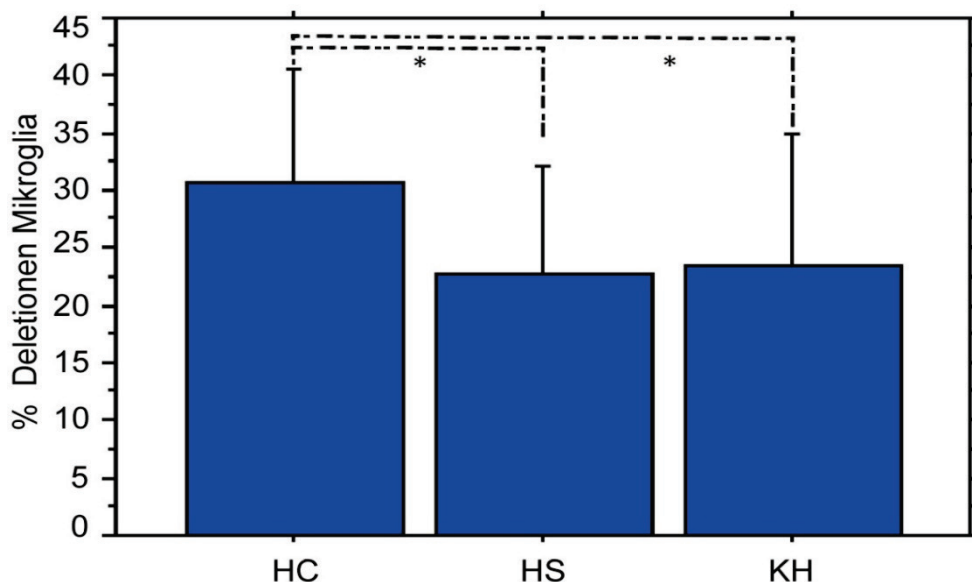


Abbildung 13: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Mikroglia im Hippokampus (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) unabhängig von der AD-Progression. * $p < 0.05$, basierend auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc Scheffé. Die Balken zeigen die Mittelwerte der mtDNA-Deletionen (%), die Whiskers die Standardabweichung.

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
HC	30.72 % ± 9.80*	33,98 % ± 9,22°	29.63 % ± 9.63	28.12 % ± 11.77
HS	22.71 % ± 9.36	22.87 % ± 9.65	21.23 % ± 10.56	26.39 % ± 4.87
KH	23.41 % ± 11.47	22.01 % ± 10.83	22.33 % ± 15.28	25.89 % ± 8.09

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung mtDNA-Deletionen der Mikroglia. Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung; HC = Hippokampus; HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn; interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz; *p < 0.05 versus HS und KH, °p < 0.05 versus HS und KH, Post-hoc Mann-Whitney

Region		Alter	PMI	Braak
HC	Rho	0.018	0.054	0.084
	Korrelation	-0.135	-0.233	-0.290
	<i>p</i> -Wert	0.525	0.277	1.161
HS	Rho	0.06	0,044	0.009
	Korrelation	0.245	0.211	0.097
	<i>p</i> -Wert	0.240	0.327	0.649
KH	Rho	0.008	0.001	0.022
	Korrelation	-0.089	-0.035	0.149
	<i>p</i> -Wert	0.663	0.865	0.461

Tabelle 5: Korrelationsanalyse der Mikroglia. PMI = post mortem Intervall, HC = Hippokampus, HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn

Die Korrelationsanalyse ergab keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Alter, dem PMI, den Braak-Stadien und den Deletionsgraden der Mikroglia in den verschiedenen Gehirnregionen.

3.2 Genexpressionsanalyse

Insgesamt wurden für die Validierung der Genexpression 43 Fälle untersucht, wovon jeweils Gewebehomogenate des Kleinhirns, des Hirnstammes und des Hippokampus verwendet wurden. Das Interesse galt dem Chemokinliganden CX3CL1, dem Trigger-Rezeptor TREM2 sowie dem Transkriptionsfaktor PPAR γ .

3.2.1 Demographische Daten

Im Folgenden werden die demographischen Daten der untersuchten Fälle tabellarisch aufgeführt. Die 43 Fälle teilten sich in 14 Fälle intermediärer Alzheimer Demenz und in 15 Fälle mit fortgeschrittener Alzheimer Demenz, sowie in 14 Kontrollfälle.

	Gesamt	Kontrolle Braak 0-I	interm.AD Braak III-IV	fortg.AD Braak V-VI
Geschlecht (m/w)	20/23	9/5	6/8	5/10
Alter (Jahre \pm SD)	74.2 \pm 10.2	68.9 \pm 7.9*	79.1 \pm 8.4	74.3 \pm 11.9
PMI (Stunden \pm SD)	29.2 \pm 17.1	25.8 \pm 19.3	36.6 \pm 18.8	26.3 \pm 11.2
RIN (Gesamtwert \pm SD)	6.0 \pm 0.8	6.3 \pm 0.7	6.0 \pm 0.8	5.8 \pm 0.7
Braak (Stadium \pm SD)	3.3 \pm 2.2	0.7 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1

Tabelle 6: Demographische Daten der untersuchten Fälle.

PMI = post mortem Intervall; interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz; SD = Standardabweichung; w = weiblich; m = männlich. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Post-hoc Scheffé, *p< 0.05 versus interm. AD

Die Fälle zeigten einen signifikanten Unterschied (p = 0.029) bezüglich des Alters zwischen der intermediären AD-Gruppe (79.1 \pm 2.2) und der Kontrollgruppe (68.9 \pm 2.1).

3.2.2 CX3CL1

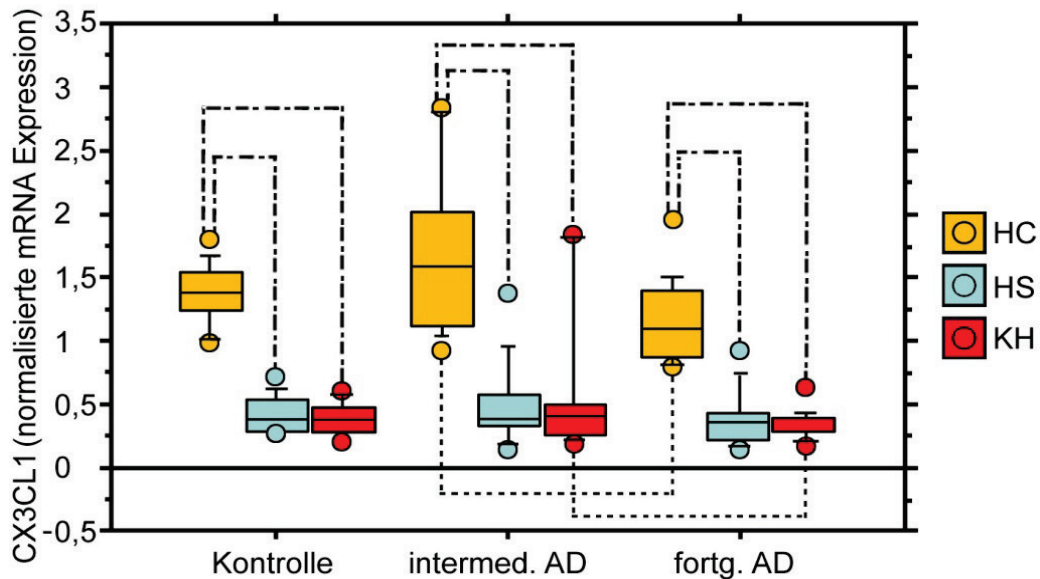


Abbildung 14: Boxplot der Genexpression von CX3CL1 im Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe und fortgeschrittener AD-Gruppe. Die signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$; Linien) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc Scheffé. Die horizontalen Linien in den Boxen repräsentieren die Mittelwerte, die Whiskers die Standardabweichungen und die Punkte die Ausreißer.

Um die Genexpressionsgrade des Chemokinliganden CX3CL1 mit der Progression der AD zu korrelieren, wurden Schnitte der drei unterschiedlichen Gehirnregionen, die unterschiedliche Vulnerabilität gegenüber AD zeigen, angefertigt. Abbildung 14 zeigt die Genexpressionsgrade aller drei Gruppen aus Kontroll-, intermediärer AD- und fortgeschrittener AD-Gruppe aus den analysierten Hirnregionen. Die Genexpression des Hippokampus war in allen drei Gruppen signifikant höher exprimiert als im Hirnstamm und dem Kleinhirn.

In der Kontrollgruppe lag die CX3CL1-Expression des Hippokampus bei 1.37 ± 0.23 und war damit höchst signifikant ($p < 0.0001$) gegenüber den Expressionsgraden des Hirnstamms (0.43 ± 0.14) und des Kleinhirns (0.39 ± 0.12). Die Expression des Hippokampus der intermediären AD-Gruppe (1.65 ± 0.66) war gegenüber der Expression des Hirnstamms (0.49 ± 0.37) höchst signifikant ($p < 0.0001$) und gegenüber dem Kleinhirn (0.64 ± 0.64) signifikant ($p = 0.0003$). Die fortgeschrittene AD-Gruppe lag in der Region des Hippokampus bei einem Expressionslevel von 1.15 ± 0.32 und war gegenüber dem

Hirnstamm (0.38 ± 0.22) und dem Kleinhirn (0.33 ± 0.10) höchst signifikant ($p < 0.0001$).

Innerhalb des Hippokampus gab es zwischen der intermediären und der fortgeschrittenen AD-Gruppe einen signifikanten Unterschied ($p = 0.0196$). Hier nimmt die Expression von 1.65 ± 0.66 (interm. AD) auf 1.15 ± 0.32 (fortg. AD) ab. Innerhalb des Hirnstammes und innerhalb des Kleinhirnes gab es zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Das Expressionslevel dieser Regionen lag im Vergleich zum Hippokampus auf relativ niedrigem Niveau.

Betrachtete man die Gehirnregionen unabhängig von der AD-Progression, so zeigte sich ein höchst signifikanter Zusammenhang ($p < 0.0001$) zwischen dem Hippokampus (1.36 ± 0.47) und dem Hirnstamm (0.43 ± 0.24) sowie zwischen dem Hippokampus und dem Kleinhirn (0.45 ± 0.39).

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
Total	0.74 ± 0.57	0.71 ± 0.48	0.88 ± 0.74	0.63 ± 0.45
HC	$1.36 \pm 0.47^{*o}$	$1.37 \pm 0.23^{*o}$	$1.65 \pm 0.66^{*ox}$	$1.15 \pm 0.32^{*o}$
HS	0.43 ± 0.24	0.43 ± 0.14	0.49 ± 0.33	0.37 ± 0.22
KH	0.45 ± 0.39	0.39 ± 0.12	0.64 ± 0.64	0.33 ± 0.10

Tabelle 7: Tabellarische Zusammenfassung der Genexpression von CX3CL1.

Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung; HC = Hippokampus; HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn; interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz; * $p < 0.0001$ versus HS, $^o p < 0.0005$ versus KH, * $p < 0.05$ versus HC fortg. AD

Region		Alter	PMI	RIN	Braak
HC	Rho	8.282E-5	0.011	0.012	0.040
	Korrelation	0.009	0.107	0.107	-0.201
	<i>p-Wert</i>	0.957	0.531	0.524	0.229
HS	Rho	0.152	0.001	0.077	0.021
	Korrelation	-0.390	0.026	0.278	-0.143
	<i>p-Wert</i>	0.013	0.876	0.087	0.387
KH	Rho	0.023	0.044	0.001	0.011
	Korrelation	-0.152	-0.210	0.038	-0.105
	<i>p-Wert</i>	0.338	0.189	0.812	0.509

Tabelle 8: Korrelationsanalyse von CX3CL1.

PMI = post mortem Intervall, RIN = RNA Integrity Number, HC = Hippokampus, HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn

Die Korrelationsanalyse ergab im Hirnstamm einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Genexpressionslevel von CX3CL1 ($p = 0.013$), jedoch keinen Zusammenhang zwischen den Braak-Stadien, dem post mortem Intervall, den RIN-Werten und der Genexpression. Alter, post mortem Intervall, RIN-Werte und Braak-Stadien hatten keinen Einfluss auf die Genexpressionslevel von Kleinhirn und Hippokampus.

3.2.3 TREM2

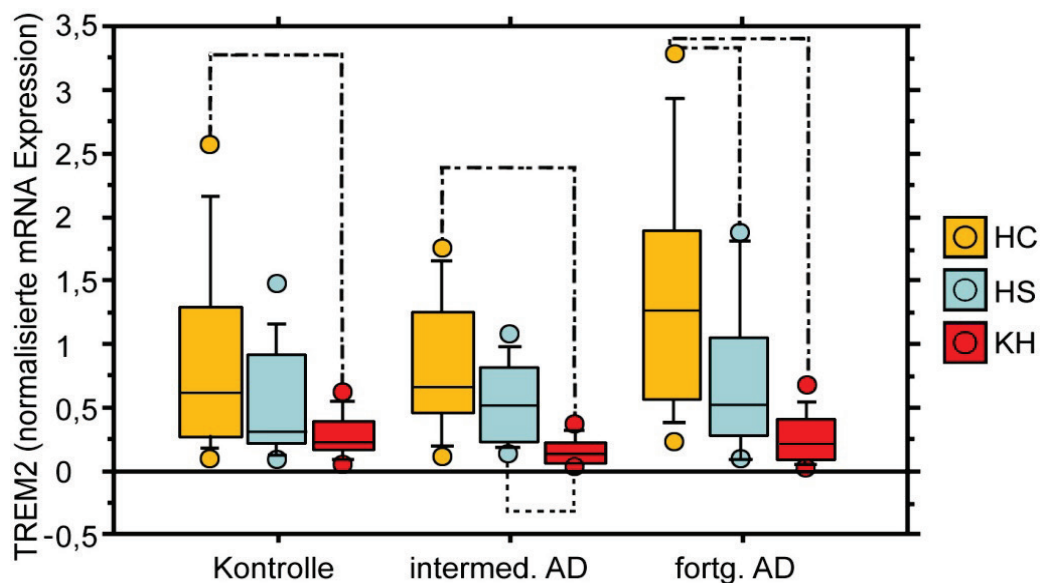


Abbildung 15: Boxplot der Genexpression von TREM2 im Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe und fortgeschrittener AD-Gruppe. Die signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$; Linien) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc Scheffé. Die horizontalen Linien in den Boxen repräsentieren die Mittelwerte, die Whiskers die Standardabweichungen und die Punkte die Ausreißer.

Das Genexpressionslevel des Trigger-Rezeptors TREM2 wurde an den unterschiedlichen Gehirnregionen der drei Gruppen untersucht. Abbildung 15 zeigt die Expressionsanteile aller drei Gehirnregionen in den jeweiligen Gruppen. Analog zu CX3CL1 war auch TREM2 im Hippokampus aller drei Gruppen stets höher exprimiert als die übrigen Regionen, die Signifikanzen unterschieden sich jedoch.

Das Expressionslevel des Hippokampus in der Kontrollgruppe lag bei 0.89 ± 0.79 und war der Expression des Kleinhirnes (0.29 ± 0.17) gegenüber signifikant ($p = 0.0266$). In der intermediären Gruppe war die Expression des Hippokampus (0.86 ± 0.54) der des Kleinhirnes (0.18 ± 0.10) gegenüber ebenfalls signifikant ($p = 0.0002$). In der Region des Hirnstammes lag die Expression von TREM2 in der intermediären Gruppe bei 0.56 ± 0.33 und ergab, verglichen mit dem Kleinhirn, einen signifikanten Unterschied ($p = 0.0274$). In der fortgeschrittenen AD-Gruppe war der Genexpressionslevel der hippocampalen Region mit 1.40 ± 0.95 gegenüber dem Kleinhirn (0.27 ± 0.20) mit $p = 0.0004$ signifikant sowie gegenüber dem Hirnstamm mit einem Expressionlevel von 0.71 ± 0.60 , Signifikanzlevel $p = 0.0371$. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede an Genexpressionsgraden von TREM2 innerhalb einer Gehirnregion zwischen den Gruppen feststellen.

Betrachtete man die Gehirnregionen unabhängig von der AD-Progression, so zeigt sich ein höchst signifikanter Zusammenhang ($p < 0.0001$) zwischen dem Hippokampus (1.07 ± 0.81) und dem Kleinhirn (0.25 ± 0.17) sowie zwischen dem Hippokampus und dem Hirnstamm (0.61 ± 0.46) mit einem Signifikanzniveau von $p = 0.0016$. Daneben fand sich eine Signifikanz ($p = 0.0153$) zwischen dem Hirnstamm und dem Kleinhirn.

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
Total	0.64 ± 0.64	0.56 ± 0.65	0.53 ± 0.45	0.81 ± 0.81
HC	$1.07 \pm 0.81^{* \circ}$	$0.89 \pm 0.79^{\circ}$	$0.86 \pm 0.54^{\circ}$	$1.40 \pm 0.95^{* \circ}$
HS	$0.61 \pm 0.46^{\circ}$	0.54 ± 0.44	$0.57 \pm 0.33^{\circ}$	0.71 ± 0.60
KH	0.25 ± 0.17	0.29 ± 0.17	0.17 ± 0.10	0.27 ± 0.20

Tabelle 9: Tabellarische Zusammenfassung der Genexpression von TREM2.

Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung; HC = Hippokampus; HS = Hirnstamm; KH = Kleinhirn; interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz; * $p < 0.05$ versus HS, $^{\circ}p < 0.05$ versus KH

Region		Alter	PMI	RIN	Braak
HC	Rho	0.003	0.045	0.001	0.053
	Korrelation	0.056	-0.213	0.025	0.230
	<i>p-Wert</i>	0.737	0.201	0.883	0.166
HS	Rho	0.011	0.036	4.506E-4	0.008
	Korrelation	-0.107	-0.190	0.021	0.089
	<i>p-Wert</i>	0.521	0.256	0.899	0.591
KH	Rho	0.129	0.084	0.016	0.003
	Korrelation	-0.359	-0.290	0.125	-0.058
	<i>p-Wert</i>	0.024	0.078	0.453	0.726

Tabelle 10: Korrelationsanalyse von TREM2.

PMI = post mortem Intervall, RIN = RNA Integrity Number, HC = Hippokampus, HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn

Die Korrelationsanalyse ergab im Kleinhirn einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Genexpressionsgrad von TREM2 ($p = 0.024$), jedoch keinen Zusammenhang zwischen den Braak-Stadien, dem post mortem Intervall, den RIN-Werten und der Genexpression. Alter, post mortem Intervall, RIN-Werte und Braak-Stadien hatten keinen Einfluss auf die Genexpressionsgrade von Hirnstamm und Hippokampus.

3.2.4 PPAR γ

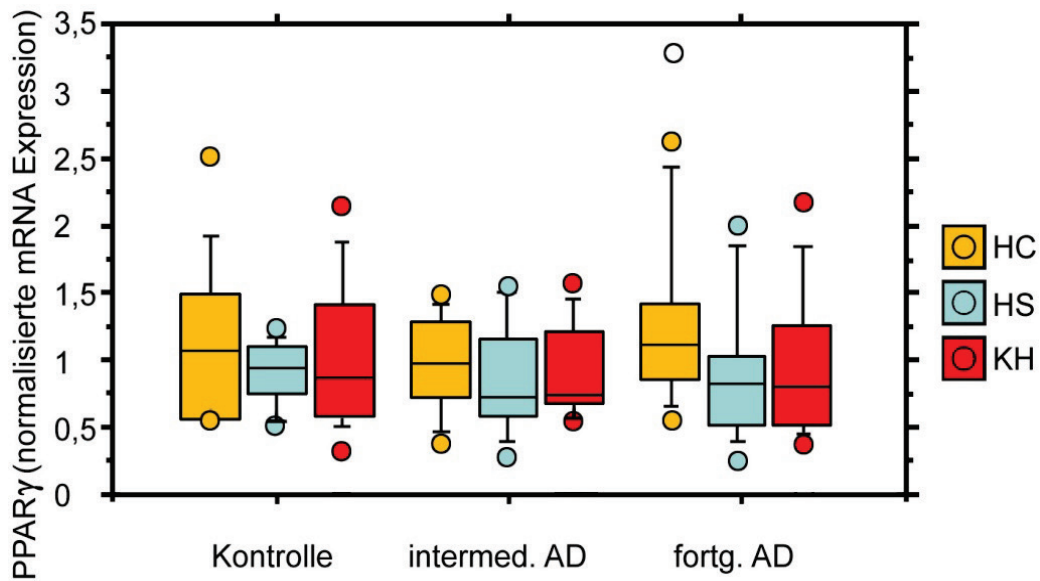


Abbildung 16: Boxplot der Genexpression von PPAR γ im Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe und fortgeschrittener AD-Gruppe. Die horizontalen Linien in den Boxen repräsentieren die Mittelwerte, die Whiskers die Standardabweichungen und die Punkte die Ausreißer.

Der Transkriptionsfaktor PPAR γ wurde ebenso an den drei Gehirnregionen mit verschiedener Vulnerabilität gegenüber AD validiert. Abbildung 16 zeigt die Genexpressionsgrade der analysierten Regionen aus Kontroll-, intermediären AD- und fortgeschrittenen AD-Fällen. Die Expressionsgrade von PPAR γ können als relativ homogen angesehen werden und blieben zwischen den Regionen innerhalb einer Gruppe sowie innerhalb einer Region zwischen den Gruppen ohne signifikante Unterschiede.

Im Hippokampus der Kontrollgruppe betrug der Expressionsgrad 1.13 ± 0.62 , der des Hirnstammes belief sich auf 0.89 ± 0.23 und die Genexpression des Kleinhirnes lag bei 1.03 ± 0.57 . In der intermediären AD-Gruppe entsprachen die Werte des Hippokampus (0.94 ± 0.36) denen des Kleinhirnes (0.94 ± 0.35). Der Expressionsgrad des Hirnstammes lag mit 0.83 ± 0.43 geringfügig darunter. In den fortgeschrittenen AD-Fällen war der Hippokampus (1.23 ± 0.62) am höchsten exprimiert, gefolgt vom Kleinhirn (0.95 ± 0.56) und Hirnstamm (0.89 ± 0.53).

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
Total	0.99±0.50	1.02±0.51	0.91±0.37	1.04±0.58
HC	1.11±0.55	1.13±0.62	0.94±0.36	1.23±0.62
HS	0.87±0.41	0.89±0.23	0.83±0.43	0.89±0.53
KH	0.97±0.49	1.03±0.57	0.94±0.35	0.95±0.57

Tabelle 11: Tabellarische Zusammenfassung der Genexpression von PPAR γ . Angaben in Mittelwert \pm Standardabweichung (Anzahl Fälle); HC = Hippokampus; HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn; interm. AD = intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD = fortgeschrittene Alzheimer Demenz

Region		Alter	PMI	RIN	Braak
HC	Rho	1.675E-4	7.258E-6	0.06	0.018
	Korrelation	-0.013	0.003	-0.246	0.135
	<i>p</i> -Wert	0.939	0.986	0.138	0.420
HS	Rho	0.015	0.009	0.025	4.412E-5
	Korrelation	-0.124	-0.096	-0.157	0.007
	<i>p</i> -Wert	0.481	0.587	0.371	0.970
KH	Rho	0.018	0.011	0.014	0.041
	Korrelation	-0.133	0.103	0.116	-0.203
	<i>p</i> -Wert	0.421	0.540	0.483	0.216

Tabelle 12: Korrelationsanalyse von PPAR γ . PMI = post mortem Intervall, RIN = RNA Integrity Number, HC = Hippokampus, HS = Hirnstamm, KH = Kleinhirn

Die Korrelationsanalyse ergab keinerlei signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Alter, den Braak-Stadien, dem post mortem Intervall, den RIN-Werten und der Genexpression von PPAR γ .

4. Diskussion

4.1 Mitochondriale Deletionen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Theorie der freien Radikale eine der wichtigsten Hypothesen bei der Entstehung und Progression der Alzheimer-Erkrankung. In Folge von oxidativen Schäden durch freie Radikale an Biomolekülen, insbesondere an der mtDNA, wird ein altersabhängiges Nachlassen der Organfunktion postuliert. Im Gehirn, einem Organ mit sehr hohem Sauerstoffverbrauch, kommt es zu einer Akkumulation von mtDNA Alterationen, vor allem von Deletionen, insbesondere der 4977bp-Deletion[15]. Über die Bedeutung und Quantifizierung dieser Deletionen in Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung gibt es einzelne zelltypspezifische Untersuchungen der mtDNA in Gehirnen mit neurodegenerativen Erkrankungen[41, 47], unter anderem eine Untersuchung aus der Arbeitsgruppe der Abteilung für Neuropathologie Würzburg[18], die sich mit einer zelltypspezifischen Quantifizierung der mtDNA-Deletionen an Gehirnen von Alzheimer-Patienten versus Kontrollen befasst hat. Während diese Untersuchungen ausschließlich an Neuronen durchgeführt wurden, gibt es zum aktuellen Zeitpunkt noch keine ähnlichen Studien an Astrozyten und Mikroglia, Zellen, deren Bedeutung im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen in den letzten Jahren zunehmend Raum für Diskussionen geboten haben.

Den Astrozyten, die lange Zeit lediglich als Stützzellen der Neurone angesehen wurden, wird nach aktuellen Daten eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Modulation der neuronalen Kommunikation, der Physiologie von Synapsen und des Energiestoffwechsels zugeschrieben[48]. Im Verlauf der Alzheimer-Erkrankung scheinen sich hypertrophe Astrozyten an dem Abbau seniler Plaques durch Akkumulation und Phagozytose zu beteiligen[49]. Der zelltoxische Effekt von Amyloid- β spiegelt sich in einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie in einer Störung des Glukosestoffwechsels wider und führt schließlich zu einer Beeinträchtigung der Viabilität der Nervenzellen[50, 51]. Es ist daher anzunehmen, dass der

erhöhte oxidative Stress auch in Astrozyten zu Alterationen der mtDNA und somit zu einer Akkumulation von Deletionen führen kann, insbesondere in den hypertrophen Astrozyten in der Nähe von Plaques. In unserer Studie konnten wir tatsächlich einen Anstieg der Deletionslast in den Astrozyten des plaquereichen Hippokampus bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung gegenüber der Kontrollgruppe feststellen.

Im Gegensatz zum Hippokampus zeigte der Hirnstamm insgesamt eine deutlich niedrigere Deletionslast mit einem nur leichten Anstieg in der intermediären Gruppe gegenüber den Kontrollen, während in der fortgeschrittenen Gruppe eine leichte Abnahme zu verzeichnen war. Rodríguez et al. konnten abseits der Plaques eine Atrophie der Astrozyten im Gehirn von transgenen AD-Mäusen, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien, nachweisen[52]. Analog dazu könnte die Abnahme der Deletionslast in der fortgeschrittenen Gruppe in unserer Studie erklärt werden.

Im Kleinhirn, welches von den AD-Veränderungen weitgehend ausgespart bleibt, zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Deletionslast analog zum Krankheitsverlauf. Sjöbeck et al. konnten in humanem Kleinhirngewebe von AD-Patienten eine zunehmende Astrogliose zeigen[53]. Dadurch könnte es zu einer Zunahme der Mitochondrien kommen und somit zu einer konsekutiven Zunahme der Deletionslast, welche unsere Beobachtung erklären könnte.

Die Hippokampusregion wies ungeachtet der AD-Progression die höchste Deletionslast in Astrozyten auf, signifikant höher als im Hirnstamm sowie auch innerhalb der Kontrollgruppe gegenüber dem Hirnstamm. Dieses Ergebnis könnte ein Indikator für die allgemeine hohe Vulnerabilität des Hippokampus gegenüber verschiedenen pathologischen Veränderungen sein, wie z.B. auch Hypoxie, die allgemein mit dem Älterwerden und prolongiertem Agonalstatus assoziiert ist.

Die Rolle der Mikroglia in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung wird kontrovers diskutiert. Unter dem Aspekt der Amyloid-Kaskade-Theorie nimmt man einerseits an, dass Amyloid- β -Ablagerungen eine chronische Entzündung

hervorrufen und so eine lang anhaltende Aktivierung der Mikroglia triggern können. Die dabei von der Mikroglia produzierten neurotoxischen Substanzen können zur Neurodegeneration beitragen. Dystrophe Mikroglia in Gehirnen von AD-Patienten führt andererseits zu der Annahme, dass die Neurodegeneration eine sekundäre Erscheinung ist, die durch seneszente Mikroglia und dem damit einhergehenden Verlust der neuroprotektiven Fähigkeiten ausgelöst wird[26].

In unserer Studie nahm die Deletionslast der Mikroglia im Hippokampus mit der AD-Progression kontinuierlich ab. Dies könnte durch die im hoch vulnerablen Hippokampus betonte Seneszenz der Mikrogliazellen, die im Krankheitsverlauf zunimmt, erklärt werden. Es ist bekannt, dass die seneszente Mikroglia einen Schwund der Verzweigungen aufweist und dadurch deutlich kleiner wird[54]. Es ist daher anzunehmen, dass derartige Veränderungen auch zu einer Reduktion der Anzahl an Mitochondrien führen, welche vorwiegend in den ramifizierten Zytoplasmabereichen vorkommen und somit die Abnahme der Deletionslast im Hippokampus erklären könnten.

Die Deletionslast im Kleinhirn, eine Region, die bekanntlich weitgehend von AD-assoziierten Veränderungen ausgespart bleibt, wies eine kontinuierliche, jedoch geringe Zunahme analog zum Krankheitsverlauf auf. Dieses Ergebnis könnte durch die begleitenden neuroinflammatorischen Prozesse, die mit dem Fortschreiten der Krankheit auch weniger vulnerable Regionen erreichen, erklärt werden.

In dem von uns untersuchten Nucleus tractus spinalis nervi trigemini konnten wir in einer vorangegangenen Studie einen Anstieg der Deletionslast in Nervenzellen analog zum Krankheitsverlauf nachweisen. Die Mikroglia zeigte ebenfalls eine höhere Deletionslast in der fortgeschrittenen Gruppe gegenüber der Kontroll- und intermediären Gruppe, wobei sich die Letztgenannten auf relativ ähnlichem Niveau befanden. Auf Grund dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass die mtDNA-Deletionen nicht als frühe Veränderungen des Hirnstamms bei AD anzusehen sind.

Beim Vergleich der Hirnregionen unabhängig von der AD-Progression stellte sich eine signifikant höhere Deletionslast im Hippokampus gegenüber dem

Hirnstamm und dem Kleinhirn dar sowie auch innerhalb der Kontrollgruppe gegenüber dem Hirnstamm und dem Kleinhirn. Dies spiegelt einmal mehr die höhere Vulnerabilität des Hippokampus gegenüber den anderen Regionen wider.

4.2 Genexpressionsanalyse

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Genexpressionsanalyse Neuroinflammations-assoziiierter Gene (CX3CL1, TREM2) und PPAR γ . Hierzu wurden Gewebehomogenate aus den bereits erwähnten unterschiedlichen Hirnregionen eingesetzt und die Genexpression im Krankheitsverlauf untersucht sowie die Regionen untereinander verglichen. Während in Tiermodellen zahlreiche Studien bezüglich der CX3CL1 Expression in verschiedenen Hirnregionen durchgeführt worden sind, gibt es nur sehr wenige systematische Untersuchungen am menschlichen Gehirn. Untersuchungen an humanen Zellkulturen haben gezeigt, dass CX3CL1 in Neuronen und Astrozyten konstitutiv exprimiert wird, und dass sein Rezeptor, CX3CR1, überwiegend in Mikroglia und Neuronen nachweisbar ist[55]. Die Interaktion zwischen CX3CL1 und seinem Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle im Verlauf der Neuroinflammation: Einerseits scheint CX3CL1 die überschüssige Mikrogliaaktivierung im physiologischen Zustand zu verhindern, andererseits fördert es die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten während entzündlicher Prozesse[56]. Für CX3CL1 stellte sich in unserer Studie eine signifikant erhöhte Expression im Hippokampus gegenüber dem Kleinhirn und Hirnstamm in jeder Patientengruppe, einschließlich der Kontrollgruppe, heraus. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Sheridan et al.[56], die zeigen konnten, dass CX3CL1 reichlich im reifen Hippokampus der Maus vorkommt und dass möglicherweise CX3CL1 eine zusätzliche Rolle in der Homöostase von Lernprozessen im gesunden Gehirn spielt. Die höhere Expression von CX3CL1 in unserer intermediären AD-Gruppe deutet auf eine Aktivierung der Neuroinflammation via CX3CL1/CX3CR1 Interaktion im Verlauf der Krankheit hin. Verglichen mit anderen Hirnregionen ist der Hippokampus eine Region mit höherer Vulnerabilität gegenüber pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel

Epilepsie, Ischämie und AD[57]. Ischämie ist im Gehirn älterer Patienten in unterschiedlichem Ausmaß sehr häufig nachweisbar und ist bekanntlich auch mit Neuroinflammation assoziiert[58]. Die niedrigere Expression von CX3CL1 in der fortgeschrittenen AD-Gruppe könnte auf den ausgeprägten Verlust der Neurone in späten Stadien der AD zurückzuführen sein. In Kleinhirn und Hirnstamm, Regionen mit geringer Vulnerabilität gegenüber AD, fand sich eine deutlich geringere Expression auf relativ konstantem Niveau in allen drei Gruppen. Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit den Beobachtungen von Kim et al.[59], die einen Anstieg der Plasma-Konzentration in Patienten mit intermediärer AD-Erkrankung gegenüber Patienten mit fortgeschrittener AD-Erkrankung zeigen konnten. Somit scheint die Plasma-Konzentration von CX3CL1 mit den neuropathologischen Stadien zu korrelieren und könnte möglicherweise als zusätzlicher Marker in der AD-Frühdagnostik eingesetzt werden. Der Zusammenhang zwischen der CX3CL1-Expression im Hirngewebe und der Plasma-Konzentration ist nicht gänzlich erklärt. Bazan et al.[60] fanden keine mRNA von CX3CL1 im peripheren Blut, wohingegen das Protein offenbar in den Endothelzellen der intrakraniellen Gefäße vorkommt[61]. Dort kann CX3CL1 von diversen Proteasen gespalten werden und somit ins periphere Blut gelangen. Steigende CX3CL1 Plasmakonzentrationen stehen möglicherweise mit dem Beginn der Neuroinflammation in frühen AD-Stadien in Zusammenhang. In späten Stadien kommt es zu einer überschießenden inflammatorischen Reaktion: Neurone und Endothelzellen sterben ab, was zu einer Abnahme der Produktion von CX3CL1 im Gehirn und damit im peripheren Blut führt[59].

TREM2 wird in myeloischen Zellen, einschließlich Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Mikroglia exprimiert[62] und ist wichtig für die Phagozytose von apoptotischen Neuronen[63]. In einer Microarray Studie von Forabosca et al.[64] an humanem post-mortem Gewebe von gesunden Individuen konnte in der Medulla oblongata und dem Hippokampus eine gesteigerte Expression von TREM2 im Vergleich zu den Basalganglien und zu den kortikalen Abschnitten gefunden werden. Von den insgesamt 10 untersuchten Regionen war die Expression im Kleinhirn am geringsten. Verglichen mit den Beobachtungen von

Forabosca et al., finden sich auch in unserer Studie Unterschiede in der Expression von TREM2 in der Kontrollgruppe. So ist die Expression des Kleinhirnes ebenfalls am geringsten, die der Medulla oblongata und des Hippokampus jedoch höher. Darüber hinaus ist die Expression von TREM2 im Hippokampus in der fortgeschrittenen AD-Gruppe höher als in der intermediären und Kontrollgruppe. Die Ursache hierfür könnte die erhöhte Zahl an aktivierter Mikroglia und Makrophagen sein, welche versuchen die geschädigten Neurone in späten Stadien der AD zu beseitigen. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Lue et al.[65] im temporalen Kortex an Patientin mit AD. Deren Studie zeigte eine jeweils signifikant erhöhte TREM2-Expression in Patienten mit fortgeschrittener AD, verglichen mit der Kontrollgruppe und der intermediären AD-Gruppe, wobei die Mikroglia die einzigen TREM2-exprimierenden Zellen sind[66].

Der Kernrezeptor PPAR mit seinen drei Isoformen α , β/δ und γ wird im gesamten menschlichen Gehirn exprimiert und hat mit seinen Liganden direkte Einflüsse auf die Nervenzellen, wie die Regulation der Neuroinflammation, der Calcium-Homöostase und mitochondrialer Funktionen[67]. In unserer vorausgegangenen Studie[68] konnte auf immunhistochemischer Ebene eine signifikant erhöhte Anzahl von PPAR γ -positiven Zellen im Hippokampus von Patienten mit AD im Gegensatz zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Auf molekularbiologischer Ebene finden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der PPAR γ -Expression zwischen den Gehirnregionen innerhalb einer Gruppe, innerhalb der Regionen im Krankheitsverlauf oder auch ungeachtet der AD-Progression.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen der Einfluss von oxidativem Stress auf die mitochondriale DNA und zum anderen die Neuroinflammation im Rahmen der Progression der Alzheimer-Erkrankung an verschiedenen Hirnregionen untersucht und mit einer Gruppe von Kontrollen verglichen. Die zu

untersuchenden Hirnregionen wurden auf Grund ihrer unterschiedlichen Vulnerabilität gegenüber neuropathologischen AD-Veränderungen ausgewählt.

Die Schädigung der mitochondrialen DNA wurde in Einzelzellanalysen in Astrozyten bzw. Mikroglia in Form von 4977 bp-Deletionen quantifiziert, die Neuroinflammation am Gewebehomogenat.

Auch wenn sich hinsichtlich der AD-Progression keine signifikanten Unterschiede der mtDNA-Deletionslast der Astrozyten und Mikroglia fanden, zeigte sich doch im vulnerablen Hippokampus die höchste Deletionslast gegenüber den weniger vulnerablen Regionen (Kleinhirn und Hirnstamm) während des Krankheitsverlaufes. Der Hippokampus, und hier vor allem das Feld CA1 (auch Sommerscher Sektor genannt), zeichnen sich durch typische Nervenzellausfälle bei unterschiedlichen Krankheiten aus. Ursachen und Pathogenese dieser selektiven Nervenzellausfälle sind trotz intensiver, mehr als hundert Jahre währender Forschung, nur unvollständig aufgedeckt. Veränderungen in der postnatalen astrozytären Genexpression von Enzymen der Glykolyse und des Glutamatstoffwechsels sowie der Retraktion von Astrozytenfortsätzen bei der Umhüllung von exzitatorischen Synapsen im CA1 Feld von Primaten [69] könnten ebenso eine Rolle spielen wie unterschiedliche kortikale Verbindungen des Hippokampus[70].

Zusammenfassend findet sich bei beiden Neuroinflammations-assoziierten Genen CX3CL1 und TREM2 eine gesteigerte Expression im Hippokampus, einer Gehirnregion mit erhöhter Vulnerabilität gegenüber den neuropathologischen Korrelaten der AD. Zudem scheint die stadienabhängige CX3CL1 Expression mit der Plasmakonzentration von CX3CL1 zu korrelieren und könnte so womöglich als zusätzlicher Marker in der AD-Frühdagnostik eingesetzt werden. Das gegenüber den AD-Veränderungen gering vulnerable Kleinhirn scheint von der Neuroinflammation erwartungsgemäß gering affiziert zu sein, wohingegen die bereits kontrovers diskutierte Rolle des Hirnstammes weiterhin unklar bleibt. Weitere Studien bezüglich der Mikroglia und ihrer Rolle in der Neuroinflammation könnten helfen deren Einfluss auf die Pathogenese von AD aufzudecken und neue Therapeutika zu entwickeln.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

1. Dickson, D.W. and R.O. Weller, eds. *Neurodegeneration: The molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. second ed. 2011, Wiley-Blackwall. 1-5.
2. Alzheimer, A., *Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*, in *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*. 1907. p. 146-8.
3. Kraepelin, E., *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. 1910: Leipzig. p. 593-632.
4. Kretschmar, H.A. and M. Neumann, [*Neuropathological diagnosis of neurodegenerative and dementia diseases*]. *Pathologe*, 2000. **21**(5): p. 364-74.
5. Duyckaerts, C., B. Delatour, and M.C. Potier, *Classification and basic pathology of Alzheimer disease*. *Acta Neuropathol*, 2009. **118**(1): p. 5-36.
6. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. *Acta Neuropathol*, 1991. **82**(4): p. 239-59.
7. Braak, H., et al., *Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry*. *Acta Neuropathol*, 2006. **112**(4): p. 389-404.
8. Montine, T.J., et al., *National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach*. *Acta Neuropathol*, 2012. **123**(1): p. 1-11.
9. Correia, S.C., et al., *Insulin-resistant brain state: the culprit in sporadic Alzheimer's disease?* *Ageing Res Rev*, 2011. **10**(2): p. 264-73.
10. Bertram, L., C.M. Lill, and R.E. Tanzi, *The genetics of Alzheimer disease: back to the future*. *Neuron*, 2010. **68**(2): p. 270-81.
11. Williamson, J., J. Goldman, and K.S. Marder, *Genetic aspects of Alzheimer disease*. *Neurologist*, 2009. **15**(2): p. 80-6.
12. Braak, H. and K. Del Tredici, *The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty*. *Acta Neuropathol*, 2011. **121**(2): p. 171-81.
13. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. *Science*, 2002. **297**(5580): p. 353-6.
14. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy*. *Physiol Rev*, 2001. **81**(2): p. 741-66.
15. Meissner, C., P. Bruse, and M. Oehmichen, *Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age*. *ExpGerontol*, 2006. **41**(5): p. 518-24.
16. Corral-Debrinski, M., et al., *Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains*. *Genomics*, 1994. **23**(2): p. 471-6.
17. Blanchard, B.J., et al., *A mitochondrial DNA deletion in normally aging and in Alzheimer brain tissue*. *Neuroreport*, 1993. **4**(6): p. 799-802.
18. Gerschütz, A., et al., *Neuron-specific mitochondrial DNA deletion levels in sporadic Alzheimer's disease*. *Curr Alzheimer Res*, 2013. **10**(10): p. 1041-6.
19. Garwood, C.J., et al., *Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2017. **43**(4): p. 281-298.
20. Morris, G.P., et al., *Microglia: a new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research*. *Neurobiol Learn Mem*, 2013. **105**: p. 40-53.

21. Prokop, S., K.R. Miller, and F.L. Heppner, *Microglia actions in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2013. **126**(4): p. 461-77.
22. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(1): p. 7-35.
23. Sidoryk-Wegrzynowicz, M., et al., *Role of astrocytes in brain function and disease*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 115-23.
24. Johnstone, M., A.J. Gearing, and K.M. Miller, *A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced*. J Neuroimmunol, 1999. **93**(1-2): p. 182-93.
25. Katsumoto, A., et al., *Ontogeny and functions of central nervous system macrophages*. J Immunol, 2014. **193**(6): p. 2615-21.
26. Streit, W.J., et al., *Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(4): p. 475-85.
27. Cardona, A.E., et al., *Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor*. Nat Neurosci, 2006. **9**(7): p. 917-24.
28. Ransohoff, R.M. and A.E. Cardona, *The myeloid cells of the central nervous system parenchyma*. Nature, 2010. **468**(7321): p. 253-62.
29. Rosenthal, S.L. and M.I. Kamboh, *Late-Onset Alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways*. Curr Genet Med Rep, 2014. **2**: p. 85-101.
30. Hsieh, C.L., et al., *A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia*. J Neurochem, 2009. **109**(4): p. 1144-56.
31. Berger, J. and D.E. Moller, *The mechanisms of action of PPARs*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 409-35.
32. Staels, B. and J.C. Fruchart, *Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists*. Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2460-70.
33. Riederer, P., et al., *The diabetic brain and cognition*. J Neural Transm (Vienna), 2017. **124**(11): p. 1431-1454.
34. Baglietto-Vargas, D., et al., *Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk*. Neurosci Biobehav Rev, 2016. **64**: p. 272-87.
35. Larner, A.J., *The cerebellum in Alzheimer's disease*. Dement Geriatr Cogn Disord, 1997. **8**(4): p. 203-9.
36. Mavroudis, I.A., et al., *Morphological changes of the human purkinje cells and deposition of neuritic plaques and neurofibrillary tangles on the cerebellar cortex of Alzheimer's disease*. Am J Alzheimers Dis Other Dement, 2010. **25**(7): p. 585-91.
37. Giess, R. and W. Schlote, *Localisation and association of pathomorphological changes at the brainstem in Alzheimer's disease*. Mech Ageing Dev, 1995. **84**(3): p. 209-26.
38. Grinberg, L.T., et al., *The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset?* Neuropathol Appl Neurobiol, 2009. **35**(4): p. 406-16.
39. Simic, G., et al., *Does Alzheimer's disease begin in the brainstem?* Neuropathol Appl Neurobiol, 2009. **35**(6): p. 532-54.
40. Polak, T., et al., *Non-invasive measurement of vagus activity in the brainstem - a methodological progress towards earlier diagnosis of dementias?* J Neural Transm, 2007. **114**(5): p. 613-9.
41. Bender, A., et al., *Dopaminergic midbrain neurons are the prime target for mitochondrial DNA deletions*. J Neurol, 2008. **255**(8): p. 1231-5.
42. He, L., et al., *Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): p. e68.
43. Pfaffl, M., *Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie*. BIOspektrum, 2011. **03.11**: p. 295-7.

44. Ruijter, J.M., et al., *Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(6): p. e45.
45. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 126-39.
46. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
47. Krishnan, K.J., et al., *Mitochondrial DNA deletions cause the biochemical defect observed in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2012. **33**(9): p. 2210-4.
48. Osborn, L.M., et al., *Astroglia: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. Prog Neurobiol, 2016. **144**: p. 121-41.
49. Filous, A.R. and J. Silver, *"Targeting astrocytes in CNS injury and disease: A translational research approach"*. Prog Neurobiol, 2016. **144**: p. 173-87.
50. Abramov, A.Y., L. Canevari, and M.R. Duchen, *Calcium signals induced by amyloid beta peptide and their consequences in neurons and astrocytes in culture*. Biochem Biophys Acta, 2004. **1742**(1-3): p. 81-7.
51. Allaman, I., et al., *Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability*. J Neurosci, 2010. **30**(9): p. 3326-38.
52. Rodriguez, J.J., et al., *Astroglia in dementia and Alzheimer's disease*. Cell Death Differ, 2009. **16**(3): p. 378-85.
53. Sjobeck, M. and E. Englund, *Alzheimer's disease and the cerebellum: a morphologic study on neuronal and glial changes*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2001. **12**(3): p. 211-8.
54. Davies, D.S., et al., *Microglia show altered morphology and reduced arborization in human brain during aging and Alzheimer's disease*. Brain Pathol, 2017. **27**(6): p. 795-808.
55. Hatori, K., et al., *Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells*. J Neurosci Res, 2002. **69**(3): p. 418-26.
56. Sheridan, G.K. and K.J. Murphy, *Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage*. Open Biol, 2013. **3**(12): p. 130181.
57. Williamson, L.L. and S.D. Bilbo, *Chemokines and the hippocampus: a new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability*. Brain Behav Immun, 2013. **30**: p. 186-94.
58. Reaux-Le Goazigo, A., et al., *Current status of chemokines in the adult CNS*. Prog Neurobiol, 2013. **104**: p. 67-92.
59. Kim, T.S., et al., *Changes in the levels of plasma soluble fractalkine in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2008. **436**(2): p. 196-200.
60. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
61. Schwaeble, W.J., et al., *Neuronal expression of fractalkine in the presence and absence of inflammation*. FEBS Lett, 1998. **439**(3): p. 203-7.
62. Hickman, S.E. and J. El Khoury, *TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease*. Biochem Pharmacol, 2014. **88**(4): p. 495-8.
63. Takahashi, K., C.D. Rochford, and H. Neumann, *Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2*. J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 647-57.
64. Forabosco, P., et al., *Insights into TREM2 biology by network analysis of human brain gene expression data*. Neurobiol Aging, 2013. **34**(12): p. 2699-714.

65. Lue, L.F., C. Schmitz, and D.G. Walker, *What happens to microglial TREM2 in Alzheimer's disease: Immunoregulatory turned into immunopathogenic?* Neuroscience, 2015. **302**: p. 138-50.
66. Lue, L.F., et al., *TREM2 Protein Expression Changes Correlate with Alzheimer's Disease Neurodegenerative Pathologies in Post-Mortem Temporal Cortices.* Brain Pathol, 2015. **25**(4): p. 469-80.
67. Aleshin, S. and G. Reiser, *Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)-alpha, beta/delta and gamma triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain.* Biol Chem, 2013. **394**(12): p. 1553-70.
68. Bartl, J., et al., *Alzheimer's disease and type 2 diabetes: two diseases, one common link?* World J Biol Psychiatry, 2013. **14**(3): p. 233-40.
69. Lavenex, P., et al., *Developmental regulation of gene expression and astrocytic processes may explain selective hippocampal vulnerability.* Hippocampus, 2011. **21**(2): p. 142-9.
70. La Joie, R., et al., *Intrinsic connectivity identifies the hippocampus as a main crossroad between Alzheimer's and semantic dementia-targeted networks.* Neuron, 2014. **81**(6): p. 1417-1428.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer Demenz (engl. Alzheimer's Disease)
Amyloid- β	Amyloid beta
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
APOE4	Apolipoprotein E4
APP	engl. Amyloid Precursor Protein
β -ME	beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BNE	BrainNet Europe
CA	Cornu ammonis
CD	engl. Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary desoxyribonucleic acid)
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CX3CL1	engl. chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, Fractalkine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
DRN	dorsaler Raphekern
E	Effizienz
EB	engl. Elution Buffer
EOFAD	engl. Early-onset familial Alzheimer's Disease
EtOH	Ethanol
fortg. AD	fortgeschrittene Alzheimer Demenz
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFAP	saures Gliafaserprotein (engl. Glial fibrillary acidic protein)
HCL	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
interm. AD	intermediäre Alzheimer Demenz
IL-1 β	Interleukin-1 beta
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KSS	Kearns-Sayre Syndrom
LOAD	engl. Late-onset Alzheimer's Disease
LMD	Laser-Mikrodissektion

mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ND1	engl. NADH dehydrogenase subunit 1
ND4	engl. NADH dehydrogenase subunit 4
NFT	neurofibrilläre Tangles
P	Signifikanzwert
PBS	engl. Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
POL	Polyester
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PSEN1	Presenilin-Gen 1
PSEN2	Presenilin-Gen 2
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RIN	engl. RNA Integrity Number
RLT	engl. RNeasy Lysis Buffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TREM2	engl. Triggering receptors expressed by myeloid cells 2
UNG	Uracil-Desoxyribonukleinsäure-Glykosylase

Soweit nicht anders angegeben, wurden in dieser Dissertation immer SI-konforme Maßeinheiten verwendet.

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der neuropathologischen Veränderungen bei AD.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der neuritischen Alzheimer-Pathologie nach Braak und Braak 1991[7], mit freundlicher Genehmigung durch die Autoren	3
Abbildung 3: Darstellung der Zwei-Schritt-Polymer Methode, Quelle: DAKO, mit freundlicher Genehmigung.....	18
Abbildung 4: Darstellung der untersuchten Regionen.....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Laser-Mikrodissektion, Quelle: LEICA, mit freundlicher Genehmigung.....	21
Abbildung 6: Darstellung der GFAP-Färbung und der CD68-Färbung vor und nach der Laser-Mikrodissektion.	23
Abbildung 7: Funktionsprinzip einer Hydrolyse-Sonde, Quelle: Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystem), mit freundlicher Genehmigung.....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms[42],_mit freundlicher Genehmigung.....	26
Abbildung 9: Darstellung von RIN Analysen, Quelle: Agilent Agilent Technologies, mit freundlicher Genehmigung.....	29
Abbildung 10: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Astrozyten	33
Abbildung 11: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Astrozyten unabhängig von der AD-Progression.....	34
Abbildung 12: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Mikroglia	36
Abbildung 13: Balkendiagramm der mtDNA-Deletionen der Mikroglia unabhängig von der AD-Progression	37
Abbildung 14: Boxplot der Genexpression von CX3CL1	40
Abbildung 15: Boxplot der Genexpression von TREM2.....	42
Abbildung 16: Boxplot der Genexpression von PPAR γ	45

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demographische Daten der untersuchten Fälle (mtDNA-Deletionen)	32
Tabelle 2: Tabellarische Zusammenfassung mtDNA-Deletionen der Astrozyten	35
Tabelle 3: Korrelationsanalyse Astrozyten.....	35
Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung mtDNA-Deletionen der Mikroglia.....	38
Tabelle 5: Korrelationsanalyse Mikroglia	38
Tabelle 6: Demographische Daten der untersuchten Fälle (Genexpression).....	39
Tabelle 7: Tabellarische Zusammenfassung der Genexpression von CX3CL1.....	41
Tabelle 8: Korrelationsanalyse CX3CL1	41
Tabelle 9: Tabellarische Zusammenfassung der Genexpression von TREM2	43
Tabelle 10: Korrelationsanalyse TREM2	44
Tabelle 11: Tabellarische Zusammenfassung der Genexpression von PPAR γ	46
Tabelle 12: Korrelationsanalyse PPAR γ	46

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu, die mich von Anfang an sehr herzlich in ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen und mich an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt hat. Für ihre uneingeschränkte und kontinuierliche Unterstützung möchte ich ihr herzlichst danken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald, Leiter des Pathologischen Institutes, möchte ich mich für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die Möglichkeit der Weiterbildung zur Fachärztin für Pathologie bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Helmut Heinsen und Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Riederer sowie Frau Prof. Dr. med. Edna Grünblatt möchte ich für die konstruktiven Ideen und Ratschläge ganz besonders danken, Frau Prof. Dr. med. Edna Grünblatt zudem für die Beratung während der statistischen Auswertung der Daten.

Herzlichen Dank sagen möchte ich Frau Dipl.-Biol. Anne Gerschütz, die mich in die Methodik dieses interessanten Forschungsprojektes eingearbeitet und im ersten Teil der Arbeit begleitet hat. Auch allen technischen Assistentinnen der Neuropathologie, Frau Andrea Staudigel, Frau Petra Herud, Frau Hannelore Schraut und Frau Michaela Hartmann danke ich für die gute Betreuung und die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein Dank geht auch an Herrn Erwin Schmitt für die hochwertige Expertise in der Bildbearbeitung dieser Doktorarbeit und den daraus entstandenen Publikation.

Für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit danke ich dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung der Universität Würzburg (IZKF) und der Edda-Neele-Stiftung in Frankfurt am Main.

Meinem Sohn Fabian, meinem Bruder Alexander, meiner Schwägerin Patricia und meinen Nichten Madleine und Jessica danke ich, dass sie so sind wie sie sind.