

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

**Über die Rolle der Neuroinflammation bei Entstehung und Progression
der Demenz vom Alzheimer-Typ**

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tim Hartmann

aus Würzburg

Würzburg, Februar 2021

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: 17.08.2021

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition und Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung	1
1.2 Stadieneinteilung	3
1.3 Mechanismen der Pathogenese	5
1.4 Auswahl der zu untersuchenden Hirnregionen und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Untersuchte Fälle und Hirnregionen	14
2.2 Vorbehandlung der Präparate	17
2.3 Immunhistochemische Färbung	17
2.4 Verwendete Antikörper und Reagenzien	21
2.5 Auswertung der Färbeergebnisse	24
2.6 Statistik	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Demographische Daten des untersuchten Patientenkollektivs	25
3.2 Verteilung der Mikroglipopulationen nach Regionen in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	26
3.2.1 CD68	26
3.2.1.1 Vergleich CD68+ Mikroglia innerhalb der Regionen	27
3.2.1.2 Vergleich CD68+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums	29
3.2.2 HLA-DR	30
3.2.2.1 Vergleich HLA-DR+ Mikroglia innerhalb der Regionen	32
3.2.2.2 Vergleich HLA-DR+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums	33
3.2.3 CD163	34
3.2.3.1 Vergleich CD163+ Mikroglia innerhalb der Regionen	36
3.2.3.2 Vergleich CD163+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums	37
3.2.4 CD206	38
3.2.4.1 Vergleich CD206+ Mikroglia innerhalb der Regionen	39
3.2.4.2 Vergleich CD206+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums	41
3.2.5 Verhältnisanalyse HLA-DR, CD163 und CD206	41
3.2.6 CCR2	44
3.2.6.1 Vergleich CCR2+ Monozyten innerhalb der Regionen	46
3.2.6.2 Vergleich CCR2+ Monozyten zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums	47
3.2.7 AT-8	48
3.2.7.1 Vergleich AT-8+ Neurone innerhalb der Regionen	49
3.2.7.2 Vergleich AT-8+ Neurone zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums	51

4. Diskussion	51
5. Zusammenfassung	56
6. Verzeichnisse	57
7. Danksagung	71
8. Lebenslauf	72

1. Einleitung

1.1 Definition und Neuropathologie der Alzheimer Erkrankung

Morbus Alzheimer ist eine der verheerendsten neurodegenerativen Erkrankungen des älteren Menschen. Sie ist eine bis heute nur unzureichend behandelbare und unterschätzte Krankheit. Für die Betroffenen und deren Angehörige ist die stetige Abnahme der kognitiven Fähigkeiten, bis hin zum Verlust der eigenen Persönlichkeit, extrem belastend. Die am häufigsten im höheren Alter auftretende Form von Demenz, die Demenz vom Alzheimer-Typ (AD), gewinnt immer mehr die Aufmerksamkeit der Forscher, insbesondere auf Grund des zunehmenden Anstiegs der Lebenserwartung und des damit verbundenen Anstiegs der Anzahl an erkrankten Personen. Bislang stehen für die jeweiligen Erkrankungen keine, oder nur unzureichende Tiermodelle zur Verfügung. Daher sind wissenschaftliche Untersuchungen an humanem postmortem Hirngewebe als essentiell einzustufen. Diese Art von Forschungsarbeit kann maßgeblich dazu beitragen ein besseres Verständnis der Erkrankung zu erlangen, um folglich daraus neue Therapieansätze entwickelt können. Bei der AD handelt es sich um eine komplexe neurodegenerative Erkrankung, die mit progressiven kognitiven Störungen einhergeht, deren Ätiopathogenese bis heute noch nicht ausreichend entschlüsselt werden konnte. Alois Alzheimer (1906), konnte nach einer histologischen Aufarbeitung im Gehirn seiner wohl bekanntesten Patientin, Auguste Deter, erstmalig pathognomonische Korrelate der später nach ihm benannten Krankheit nachweisen. Makroskopisch beschrieb er eine ausgeprägte Gehirnatrophie sowie arteriosklerotische Veränderungen der großen Hirnarterien. Mikroskopisch gehören dazu die veränderten Neurofibrillen innerhalb und miliare Ablagerungen (sog. senile Plaques) außerhalb der Nervenzellen (Alzheimer, 1907) ,wobei die genaue Definition des Begriffs „senile plaque“ auf Grund der morphologischen Eigenschaften und der in der Literatur oftmals nicht einheitlichen Verwendung komplex ist (Duyckaerts et al., 2009; Larner, 1997). Senile Plaques bestehen größtenteils aus Zusammenlagerungen pathologischer Formen des β -Amyloid-Proteins ($A\beta$),

Spaltprodukte eines häufig vorkommenden Membranproteins, dem sog. Amyloidvorläuferprotein („amyloid-precursor“-Protein, APP), wohingegen Neurofibrillen (Alzheimer-Fibrillen, „neurofibrilläre Tangles“, NFT) intrazellulären Anhäufungen hyperphosphorylierter Tau-Proteine entsprechen (**Abbildung 1**) (Kretzschmar & Neumann, 2000)

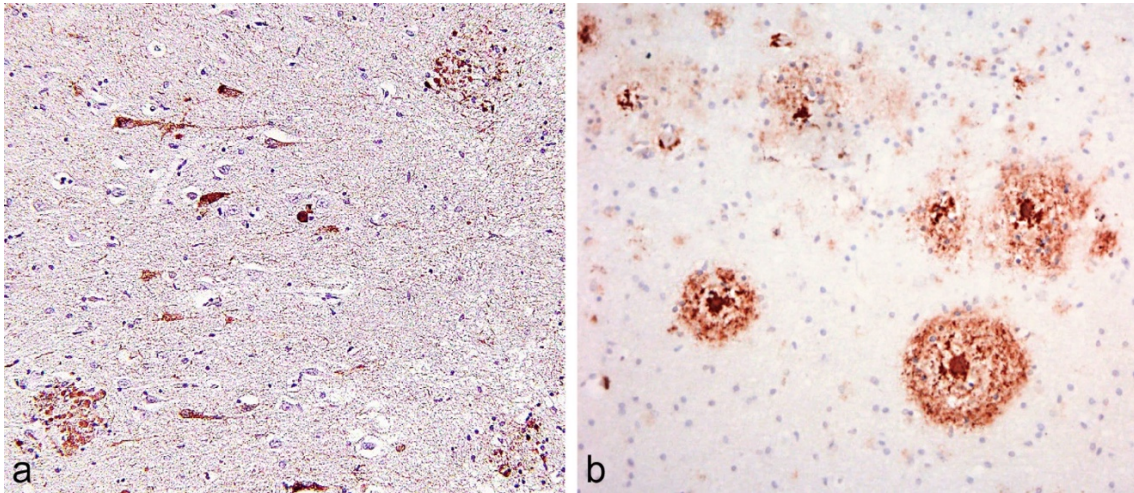


Abbildung 1: Darstellung der neuropathologischen Veränderungen bei AD, a: neurofibrilläre Tangles, b: β -Amyloid-Plaques, Vergrößerung 200x

Der Untergang von Neuronen und der Verlust von Synapsen stellen einen weiteren wesentlichen Bestandteil der Neurodegeneration dar und spiegeln vor allem in fortgeschrittenen Stadien die für AD typische Hirnatrophie wider.

Neu in den Vordergrund gerückt ist die Erforschung der durch Mikroglia und Astrozyten hervorgerufenen reaktiven Prozesse, als Ursache und/oder Folge der Entstehung AD typischer Läsionen.

1.2 Stadieneinteilung

Die Entstehung der AD typischen neuropathologischen Veränderungen, wie die Akkumulation von pathologischen Formen der Proteine β -Amyloid ($A\beta$) und Tau, ist ein langsamer, über mehrere Jahrzehnte stetig voranschreitender Prozess.

Im Hirngewebe eines Patienten mit AD kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einem charakteristischen Ausbreitungsmuster. Beide oben erwähnten Veränderungen (die extrazelluläre $A\beta$ -Ablagerung und die Anhäufung intraneuronaler Tau-Aggregate) haben innerhalb der Hirnrinde umschriebene Prädilektionsstellen. Von dort breiten sie sich kontinuierlich auf andere Hirnregionen aus und nehmen an Schweregrad zu. Man kann somit zwischen früh betroffenen, hochvulnerablen Hirnarealen (wie z.B. dem Hippokampus) (Braak & Braak, 1991) und Arealen mit deutlich niedrigerer Vulnerabilität unterscheiden, die später oder gar nicht betroffen sind (wie z.B. dem Kleinhirn). (Larner, 1997)

Anhand des pathognomonischen Ausbreitungsmusters von NFT teilten Eva und Heiko Braak (1991) das Ausmaß und das Fortschreiten der kortikalen Veränderung in die Stadien I-VI. Ihren Beobachtungen zufolge ist die Hippokampusformation, wozu der Hippokampus proper mit Fascia dentata und Cornu ammonis (CA), sowie der Subikularkomplex und Regio enthorinalis gezählt werden (Andersen, 2007), die zuerst befallene Region. Die ersten Tangles lassen sich im Stadium I am Übergang zwischen dem entorhinalen Kortex und dem temporalen Isokortex (der sog. transentorhinalen Rinde) finden. Danach weiten sie sich auf die Entorhinalrinde aus (Stadium II). Von dort breiten sich die Veränderungen auf den CA1-Sektor des Hippokampus (Stadium III) und später auch auf einzelne isokortikale Bezirke, insbesondere den unteren Temporallappen (Stadium IV) aus. In den späteren Stadien sind ausgedehnte Abschnitte der Assoziationsrinde in allen Hirnlappen erkrankt, wohingegen die primären Rindfelder zunächst ausgespart bleiben (Stadium V). Im Stadium VI ist die gesamte Großhirnrinde betroffen. Die Braaksche Stadieneinteilung wurde im Verlauf von verschiedenen Autoren ergänzt und erweitert (Montine et al., 2012).

Die vom „National Institute on Aging“ (NIA) 1997 erstmals erstellte und folglich mehrfach überarbeitete Guideline „National Institute on Aging/Reagan Institute of the Alzheimer Association consensus recommendations for the postmortem

diagnosis of AD or NIA-Reagan Criteria“ oder kurz die “1997 Criteria” zur Diagnostizierung und Stadieneinteilung der Alzheimerschen Erkrankung findet heute die größte Verwendung. Darin werden die gängigsten Diagnoseparameter, also β -Amyloid, Braak und CERAD, zu dem sogenannten „ABC-Score“ zusammengeführt. Anschließend definierte die Arbeitsgruppe auf Grund des charakteristischen Verlaufs der Erkrankung drei Stadien, angefangen mit dem „präklinischen Stadium“, über das Stadium des „mild cognitive impairment“, bis zum Endstadium, der „Alzheimerschen Demenz“, nachdem erkannt wurde, dass in einigen Fällen noch vor der klinischen Verschlechterung kognitiver Funktionen die AD-typischen pathologischen Veränderungen im Gehirn auftraten. Dem folgend haben Braak und Braak ihre ursprüngliche Einteilung (Braak & Braak, 1991) modifiziert und um die Pretanglestadien „a,b,c und 1a, 1b“ ergänzt (Braak et al., 2011). Zudem sollte mit dieser Erweiterung ein Rahmen geschaffen werden, in dem die pathophysiologischen Veränderungen entlang des Krankheitskontinuums zusammen mit der klinischen Symptomatik des individuellen Patienten berücksichtigt wird. (Hyman et al., 2012)

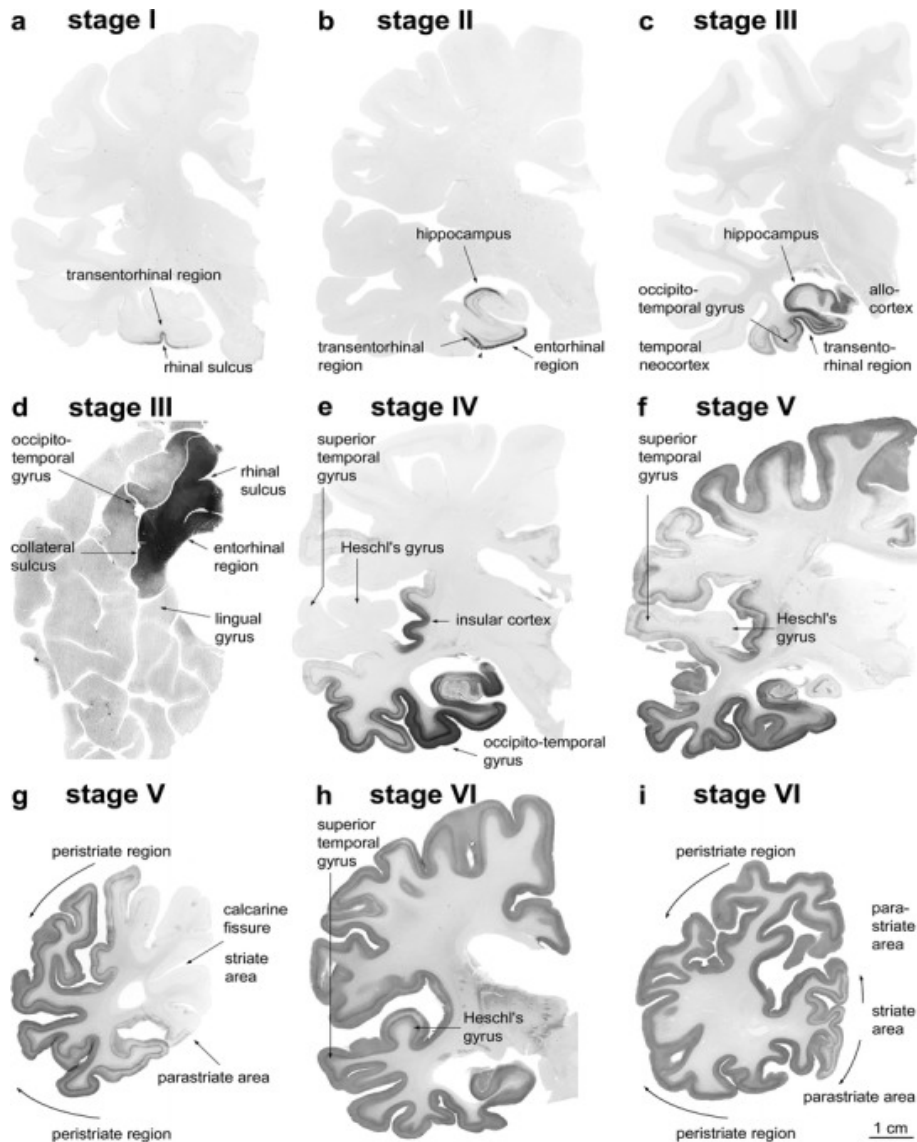


Abbildung 2: Schematische Darstellung der neuritischen Alzheimer-Pathologie nach Braak und Braak 1991, mit freundlicher Genehmigung durch den Autor (Braak & Braak, 1991).

1.3 Mechanismen der Pathogenese

Über 90% der Erkrankungen treten sporadisch auf und meistens nach dem 65. Lebensjahr, während etwa 2 bis 5% der Fälle genetisch bedingt sind (Blennow et al., 2006). Auf genetischer Ebene wurde eine Variante im Gen für das Apolipoprotein E4 (ApoE) identifiziert, die einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Alzheimer-Erkrankung darstellt. Darüber hinaus wurden kausale autosomal-dominant vererbte Missense-Mutationen in drei verschiedenen Genen gefunden,

Präsenilin-1, Präsenilin-2 und APP, die als Auslöser der seltenen früh auftretenden Unterform gelten („early-onset AD“) (Bertram et al., 2010; Williamson et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend Fälle mit einem Alter über 70 Jahren, passend zu der sporadischen Form der AD („late-onset AD“), untersucht. In den letzten Jahrzehnten sind zahlreiche Hypothesen zur Pathogenese der sporadischen AD entwickelt worden, wobei die Mechanismen zur Entstehung immer noch nicht geklärt werden konnten. Aus diesem Grund gibt es bis dato keine geeignete Therapie, die nach Krankheitsausbruch eine Heilung versprechen kann. Die gängigen Therapieansätze zielen betont auf die Prävention und erreichen lediglich eine Verlangsamung des Fortschreitens für wenige Monate nach Beginn der Erkrankung.

Eine der frühesten Veränderungen in Neuronen von Patienten mit AD ist die pathologische Anhäufung von hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Das Tau-Protein ist ein Phosphoprotein und findet sich im distalen Anteil von Axonen, nicht aber in Dendriten. Es moduliert dort mit Tubulin den Aufbau und die Stabilität des Mikrotubulsystems gesunder Neuronen. Die Phosphorylierung von Tau wird durch Kinasen und Phosphatasen reguliert und sorgt physiologischerweise für die Unterbrechung der Mikrotubuli-Organisation (Taniguchi et al., 2001). Hyperphosphorylierung von Tau wird zum einen durch ein Ungleichgewicht zwischen Tau-Kinasen und Tau-Phosphatasen und zum anderen durch eine durch Konformationsänderungen hervorgerufene Störung der Interaktion mit diesen Enzymen ausgelöst (Iqbal et al., 2005).

Bei AD Patienten lagert sich das abnorm hyperphosphorylierte Tau zu NFTs oder feineren Neuropilfäden (sog. „neuropil threads“) zusammen. Diese Fibrillen besitzen eine schlechte Löslichkeit und wirken neurotoxisch, indem sie sowohl den axonalen Transport von z.B. Nährstoffen verhindern, als auch Synapsen blockieren und damit das Neuron „verklumpen“. Es kommt zur retrograden Degeneration betroffener Neurone, die sich mit der Produktion von neuem Tau und der Abkapselung der angehäuften NFTs zu retten versuchen (Iqbal & Grundke-Iqbal, 2008). Aktuelle Forschungsergebnisse suggerieren, dass der Verbreitung der Tauopathie auf weitere Hirnareale ein Mechanismus der Exosomen-basierten Sekretion

der NFT's und eine Beteiligung der Mikroglia an der Übertragung zu Grunde liegen könnte (Asai et al., 2015; Clavaguera et al., 2009).

Bemerkenswerterweise sind pathologische Tau-Ablagerungen zwar typisch, aber nicht spezifisch für AD. Sie kommen auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. bei der kortiko-basalen Degeneration (CBD) oder der progressiven supranukleären Blickparese (PSP) vor (Lamb et al., 2016).

Neben der Tauopathie ist die extrazelluläre Akkumulation von A β zu sogenannten Amyloid Plaques ein weiteres neuropathologisches Kennzeichen der AD. Außer dem A β , das mit 90% den Hauptbestandteil ausmacht, bestehen die Plaques zudem aus Apolipoprotein E, Präsenilin, Ubiquitin und anderen Molekülen (Diaz-Nido et al., 2002). Das A β , dessen genaue Funktion bis heute ungeklärt ist, entsteht durch enzymatische Spaltung mittels β - und γ -Sekretasen aus dem APP. Das physiologischerweise vorkommende bis zu 42 Aminosäuren lange Peptid allein ist nicht toxisch und besitzt vermutlich sogar antimikrobielle Eigenschaften (Gosztyla et al., 2018) Erst die Anhäufung zu unlöslichen Amyloid-Plaques stellt eine neuropathologische Läsion dar (Gouras et al., 2015).

Von den hauptsächlich extrazellulär in der grauen Hirnsubstanz abgelagerten Amyloid Plaques können zwei Hauptformen morphologisch unterschieden werden: neuritische (senile) und nicht neuritischen (diffuse) Plaques. Neuritische Plaques haben einen zentral gelegenen Amyloid Kern (core), bestehend aus dicht zusammengelagerten A β -Fibrillen, der von dystrophen Neuriten umgeben ist. In ihrer Nähe finden sich zudem aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten, sowie molekulare Entzündungsmediatoren (Zytokine, C-reaktives Protein). Diffuse Plaques hingegen haben keinen Amyloid Kern mit dystrophen, Tau-immunoreaktiven Neuriten eingeschlossen, weisen nur zum Teil Amyloid auf und liegen weiter verstreut und weniger konzentriert im Extrazellularraum (EZR) als die senilen Plaques (Itagaki et al., 1989).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von postmortalen Gehirnen konnten zeigen, dass alle Formen der Plaques, diffuse Plaques eingeschlossen, durch eine umliegende neuritische und synaptische Dystrophie gekennzeichnet sind (Gouras et al., 2010; Takahashi et al., 2004).

Dennoch gilt es zu beachten, dass das Vorhandensein von Plaques zwar ein Diagnosekriterium von AD darstellt, aber alleine betrachtet nicht direkt zum Ausbruch der AD, gemessen am Abbau kognitiver Fähigkeiten, führt, da Amyloid-Plaques ohne Tau-Ablagerungen auch bei älteren Personen ohne Zeichen einer Demenz beschrieben worden sind (Mortimer, 2012).

Eine etwas neuere Hypothese zur Entstehung der AD basiert auf Mechanismen der Neuroinflammation, einer hirnspezifischen, durch die Mikroglia getragenen Immunantwort. Der Mikroglia werden sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Eigenschaften beigemessen (Aguzzi et al., 2013). Während die meningealen, perivaskulären und die im Plexus choroideus befindlichen Makrophagen myeloischer Herkunft sind, entstammt die intraparenchymatöse Mikroglia dem Dottersack (Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010) (**Abbildung 3**). Somit stellen die Mikrogliazellen und die aus dem Knochenmark stammenden Monozyten/Makrophagen zwei genetisch distinkte Zellpopulationen dar, mit unterschiedlichen Charakteristika und Funktionen (Hickman et al., 2013).

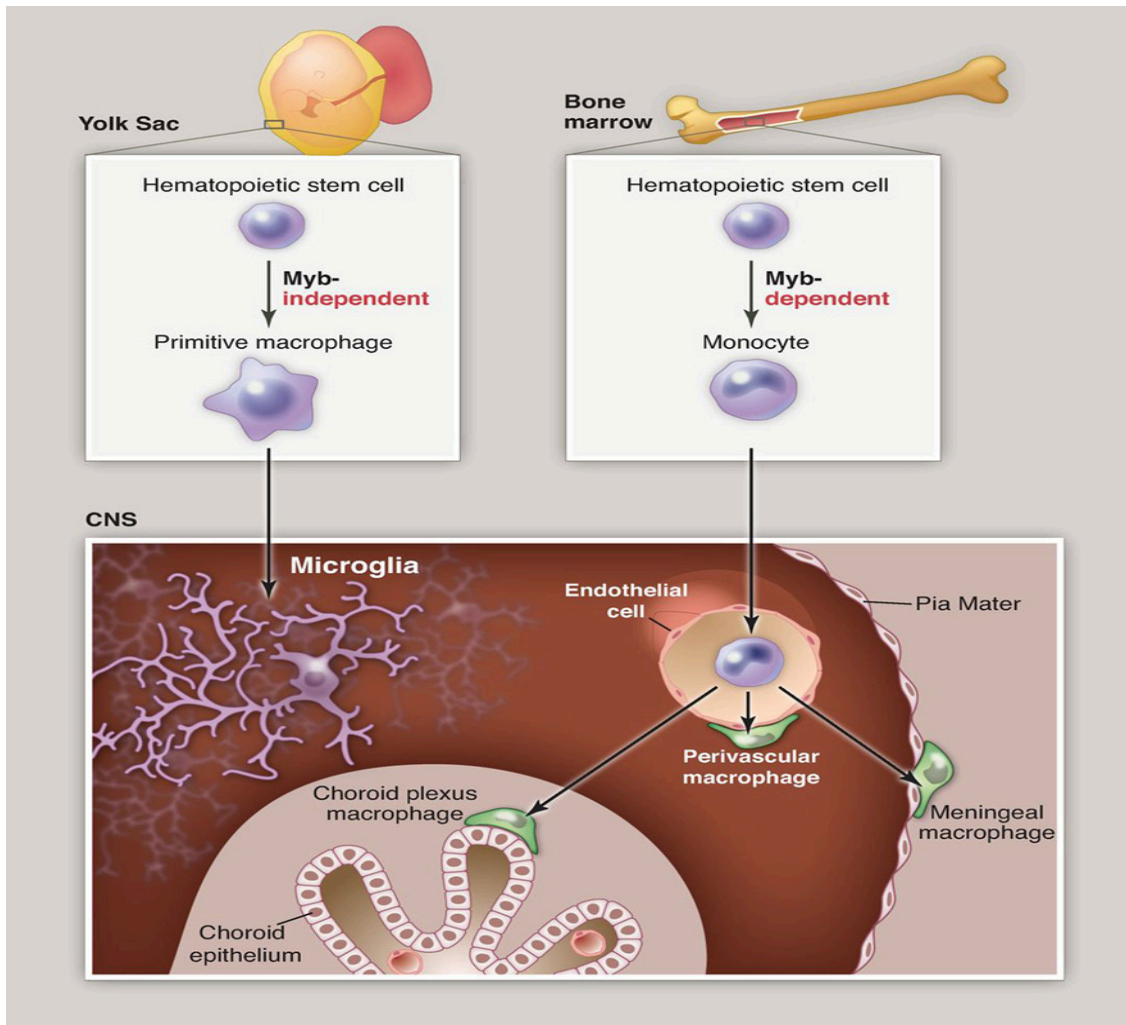


Abbildung 3: Darstellung der unterschiedlichen Herkunft von Mikroglia und Makrophagen des ZNS, Quelle: Science, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Aguzzi (Aguzzi et al., 2013)

Im physiologischen Zustand findet man im Gehirn die sog. „ruhende“ Mikroglia. Diese weist einen runden, kompakten Zellkörper und stark verzweigte Fortsätze, die Kontakt zu den Synapsen herstellen, auf. Die ruhende Mikroglia misst etwa $3 \times 8 \mu\text{m}$, wohingegen die aktivierte Mikroglia mit rund $20 \times 15 \mu\text{m}$ deutlich größer ist.

Es wird inzwischen von einer Vielzahl von Neurowissenschaftlern angenommen, dass die Mikroglia/Makrophagen auf Veränderungen im Hirngewebe im Verlauf der AD unterschiedlich reagieren. So wurden im Laufe der letzten Jahre mehrere sog. Polarisationszustände dieser Zellen beschrieben und definiert: die klassische Aktivierung (M1) und die alternative Aktivierung (M2), wobei hier manche

Autoren noch zusätzlich zwischen M2a und M2b oder sogar M2c unterscheiden (Walker & Lue, 2015).

Die klassische M1-Polarisation ist offenbar proinflammatorisch und ruft zytotoxische Mediatoren hervor, während die alternative M2-Polarisation die Inflammation dämpft und die Geweberegeneration fördert (Block et al., 2007; Chawla et al., 2011). Dies scheint eine etwas vereinfachte Ansicht der unterschiedlichen Funktionen aktivierter Mikroglia zu sein, liefert jedoch wichtige Informationen zum proinflammatorischen oder phagozytierenden Phänotyp.

In den letzten Jahren wurden mehrere Marker für die jeweiligen Polarisationsstadien der Mikroglia/Makrophagen beschrieben, wobei unter den Wissenschaftlern noch keine Einigkeit diesbezüglich erreicht wurde.

Die Verfügbarkeit von Markern zur Identifizierung unterschiedlicher Phänotypen ist relativ limitiert und die aktuell verfügbaren Antikörper erlauben lediglich inkomplette Informationen zur Funktion oder zum Polarisationsstatus der Mikroglia im Hirngewebe von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen.

Ein häufig eingesetzter Marker, der sowohl ruhende als auch aktivierte Mikroglia sowie periphere Makrophagen markiert, ist CD68, auch unter dem Namen Macrosialin bekannt (Holness & Simmons, 1993). CD68 ist ein Oberflächenprotein und ein Zelladhäsionsmolekül, gehört zur Familie der Klasse D Scavenger-Rezeptoren und markiert auch Lysosome, so dass er auch zur Darstellung aktiv phagozytischer Mikroglia geeignet ist (Fiala et al., 2002). Mit Hilfe dieses Markers konnten an postmortem Hirngewebe in zahlreichen Studien Hirnregion-abhängige Unterschiede in gesunden Gehirnen (Mittelbronn et al., 2001) sowie eine Zunahme im Verlauf der AD verzeichnet werden (Dal Bianco et al., 2008).

Zur Identifizierung „aktivierter“ Mikroglia und vor allem des M1-Polarisationsstatus wird häufig das „Major Histocompatibility Complex class II“ (MHC-II) Protein HLA-DR eingesetzt (Heneka et al., 2015; Perry et al., 2010). MHC-II wird von antigenpräsentierenden Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert und ist verantwortlich für Antigenerkennung und Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Innerhalb des Gehirns wird es primär von Mikroglia exprimiert und gilt als Marker aktivierter Zellen, obwohl es vermutlich auch schwächer von ruhenden Zellen ex-

primiert wird (Lee et al., 2002). In mehreren Studien konnte eine deutliche Akkumulation von HLA-DR+ Mikrogliazellen um Amyloid-Plaques und NFTs bei AD Patienten und in der Umgebung der Substantia nigra bei Parkinson Patienten nachgewiesen werden (Akiyama et al., 2000; McGeer et al., 1988). Die enge Interaktion aktivierter HLA-DR exprimierender Mikroglia mit AD typischen pathologischen Veränderungen deutet auf eine Aktivierung der Mikroglia durch diese Strukturen hin und lässt vermuten, dass diese nun aktivierte Mikroglia mit ihrer proinflammatorischen Ausrichtung den pathologischen Prozess weiter vorantreiben (Walker & Lue, 2015).

Für den alternativen M2-Polarisationsstatus werden am häufigsten die Marker CD163 und CD206 eingesetzt (Fabriek et al., 2005; Lau et al., 2004; Moehle & West, 2015; Walker & Lue, 2015).

CD163 ist ein membranständiges Glykoprotein, welches zu der Klasse B der Scavenger-Rezeptoren gehört und verantwortlich für die Beseitigung extrazellulärer Haptoglobin-Hämoglobin-Komplexe ist (Schaer et al., 2007). Es ist in der Lage sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien zu erkennen und zu binden und spielt daher eine wichtige Rolle in der Immunabwehr (Fabriek et al., 2009). Es besitzt zudem immunregulatorische Funktionen und ist mit der Auflösungsphase der Inflammation assoziiert (Pey et al., 2014). Zu der Rolle und Verteilung CD163 exprimierender Zellen im Verlauf der AD gibt es zum aktuellen Zeitpunkt nur wenige Daten (Dal Bianco et al., 2008; Pey et al., 2014).

CD206 ist ein Mannose-Rezeptor, der der Erkennung mikrobieller Kohlenhydrate dient und die Phagozytose seiner Liganden einleitet. Er aktiviert immunsuppressive Signalwege, die in verringerten Konzentrationen von proinflammatorischen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-12 (IL-12) und erhöhten Expressionsspiegel von antiinflammatorischen Faktoren wie IL-10 und IL-1R α resultieren (Chieppa et al., 2003; Kerrigan & Brown, 2009). Er stellt somit einen protypischen Oberflächenmarker für vor allem perivaskulär sitzender antiinflammatorischer, M2 gepolter Mikroglia dar (Galea et al., 2005).

Diese Studienergebnisse untermauern die Neuroinflammationshypothese, bei der davon ausgegangen wird, dass eine aberrante Aktivierung der Mikroglia Funktionsstörungen und den Untergang von Neuronen vorantreiben. Zusätzlich

wird diese Hypothese von genomweiten Assoziationsstudien unterstützt, die Polymorphismen in inflammationsassoziierten Genen (HLA-DR B1/B5 eingeschlossen) als Risikofaktor für die Entstehung von AD identifizieren konnten (Lambert et al., 2013). Somit könnte die Mikrogliaaktivierung auch als Kausalfaktor und weniger als „Begleiterscheinung“ der AD-Pathologie angesehen werden.

Jüngste Forschungsergebnisse konnten distinktive Unterschiede in der Funktion von hirnständiger Mikroglia und „bone marrow derived microglia“ (BMDM) nachweisen und heben die neuroprotektiven Eigenschaften letzterer hervor. Dieser Effekt wird dadurch erklärt, dass BMDM, im Gegensatz zur Mikroglia, die ihre Ausrichtung auf inflammatorische Zustände z.B. ändern und diese beschleunigen, ihre funktionelle Spezialisierung auch nach dem Einwandern ins CNS behalten (London et al., 2013).

Der wichtigste Rezeptor dieser Zellen ist der C-Chemokin Rezeptor Typ 2 (CCR2), der auf der Oberfläche von Monozyten, einem kleinen Teil von natürlichen Killerzellen (NK) und T-Zellen exprimiert wird und die Migration von Lymphozyten, dendritischen Zellen des peripheren Blutes und Monozyten/Makrophagen vermittelt (Mack et al., 2001; Saederup et al., 2010). CCL2 als Hauptligand von CCR2 bindet ausschließlich an BMDM/Monozyten und ist der stärkste Aktivator der Signaltransduktionskette für die Leukodiapedese von BMDM ins Hirnparenchym (Conductier et al., 2010; Deshmane et al., 2009). In AD Mausmodellen wurde gezeigt, dass A β die Expression des inflammatorischen CCL2 stimuliert, das zwar keinen Effekt auf die A β Produktion hat, aber die Ausbildung von A β -Oligomeren und Progression der neurokognitiven Dysfunktion nachweislich beschleunigt (Kiyota et al., 2009; Yamamoto et al., 2005). Welche Rolle die aus dem Blut eingewanderten CCR2+ Monozyten bei der Pathogenese der AD einnehmen ist weitestgehend ungeklärt. Haben sie mit ihren phagozytotischen Eigenschaften einen positiven Einfluss auf die Beseitigung der Amyloid Plaques, oder befeuern sie nur wieder die inflammatorische Kaskade indem sie z.B. weitere Leukozyten anlocken?

1.4 Auswahl der zu untersuchenden Hirnregionen und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit:

Basierend auf der unterschiedlichen Vulnerabilität verschiedener Hirnregionen gegenüber Alzheimer-assoziierten Veränderungen, wurden für die Untersuchungen folgende Regionen ausgewählt:

- der Hippokampus, (HC), der laut klassischer Stadieneinteilung als eine der am frühesten befallenen kortikalen Regionen beschrieben wird (Stadium I-II)
- der okzipitale Kortex (OL), als eine der am spätesten, im Endstadium befallenen Regionen im Verlauf der AD (Stadium V-VI)
- das Kleinhirn (KH), das weitgehend von Tau-Ablagerungen auch im fortgeschrittenen Stadium ausgespart bleibt und
- der Hirnstamm (HS) (speziell die Region um den Locus coeruleus (LC)), der zwischen dem kaum betroffenen Rückenmark und dem stark betroffenen Großhirn lokalisiert ist und daher von besonderem Interesse ist (Giess & Schlote, 1995). Insbesondere auch weil seine Beteiligung an der AD kontrovers diskutiert wird: abnormale Tau-Ablagerungen konnten im Coeruleus-/Subcoeruleuskomplex, ohne Vorliegen von NFTs oder Amyloid- β , in Gehirnen von jungen Individuen nachgewiesen werden (Braak & Del Tredici, 2011).

Zielsetzung der Arbeit war es, an den oben genannten, unterschiedlich vulnerablen Hirnregionen, das Ausmaß und die Verteilung der verschiedenen, in der Einleitung bereits beschriebenen Mikroglia-subpopulationen im Verlauf der AD-Progression mittels immunhistochemischen Untersuchungen zu identifizieren und mit einer Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten ohne klinischen und neuropathologischen Nachweis einer neurologischen oder neurodegenerativen Erkrankung zu vergleichen. Dies sollte uns einen Einblick in die Funktion hirneigener Immunzellen (Mikroglia) im Verlauf der AD Erkrankung ermöglichen und auch Informationen über eine eventuelle Mitbeteiligung eingewanderter Immunzellen

(Monozyten) an den neurodegenerativen Veränderungen liefern, um so ein besseres Verständnis über die Rolle der Neuroinflammation bei der Entstehung und Progression zu erzielen.

Die zunehmende Gewinnung von Erkenntnissen bezüglich der Neuroinflammation gibt Anlass zur Hoffnung, dass durch gezielt eingesetzte immunmodulierende Therapieansätze, zunehmend verbesserte Ergebnisse in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen in naher Zukunft erreicht werden könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchte Fälle und Hirnregionen

Untersucht wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Hirngewebe von 28 Fällen aus der 1999 (Ethikvotum der Universität Würzburg 78/99) in der Neuropathologie Würzburg etablierten Hirnbank. Das Gewebe wurde mit Zustimmung der Spender zu Lebzeiten oder mit Zustimmung der nächsten Angehörigen entnommen und für die Studie zusätzlich ein Ethikvotum der Universität Würzburg eingeholt (99/11). Die Entnahme des Hirngewebes fand im Rahmen klinischer Sektionen zwischen den Jahren 1999 und 2012 statt und wurde in der Abteilung für Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg neuropathologisch begutachtet.

Die Schweregradeinteilung der Alzheimer Erkrankung (=Stadieneinteilung) geschah nach Braak und Braak (Braak & Braak, 1991) und den sog. CERAD-Kriterien (Fillenbaum et al., 2008) (Hyman et al., 2012; Montine et al., 2012) und ergab die Einteilung in drei Gruppen:

1. Braak-Stadium 0-I, CERAD A: 9 Patienten
2. Braak-Stadium III-IV, CERAD A-B: 8 Patienten
3. Braak-Stadium V-VI, CERAD C: 11 Patienten

Durch Einsicht in die Patientenakten wurden demografische und klinische Daten wie Alter, Geschlecht, Todesursache und Stunden/Tage postmortal bis zur Entnahme und Fixierung des Gehirns in Formalin erfasst.

Das Alter der Patienten rangierte zwischen 40 und 86 Jahren, der Altersdurchschnitt lag bei 72 Jahren. Die Geschlechterverteilung war leicht unausgeglichen, mit 17 weiblichen und 11 männlichen Patienten. Die häufigste Todesursache der Patienten (14 von 28 Probanden) war Herz-Kreislaufversagen.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurden für die Untersuchungen 4 verschiedene Hirnregionen mit unterschiedlicher Vulnerabilität gegenüber Alzheimer-assoziierten Veränderungen ausgewählt: Hippokampus, okzipitaler Kortex, Kleinhirn und Brücke. Die untersuchten Regionen sind in **Abbildung 4** dargestellt.

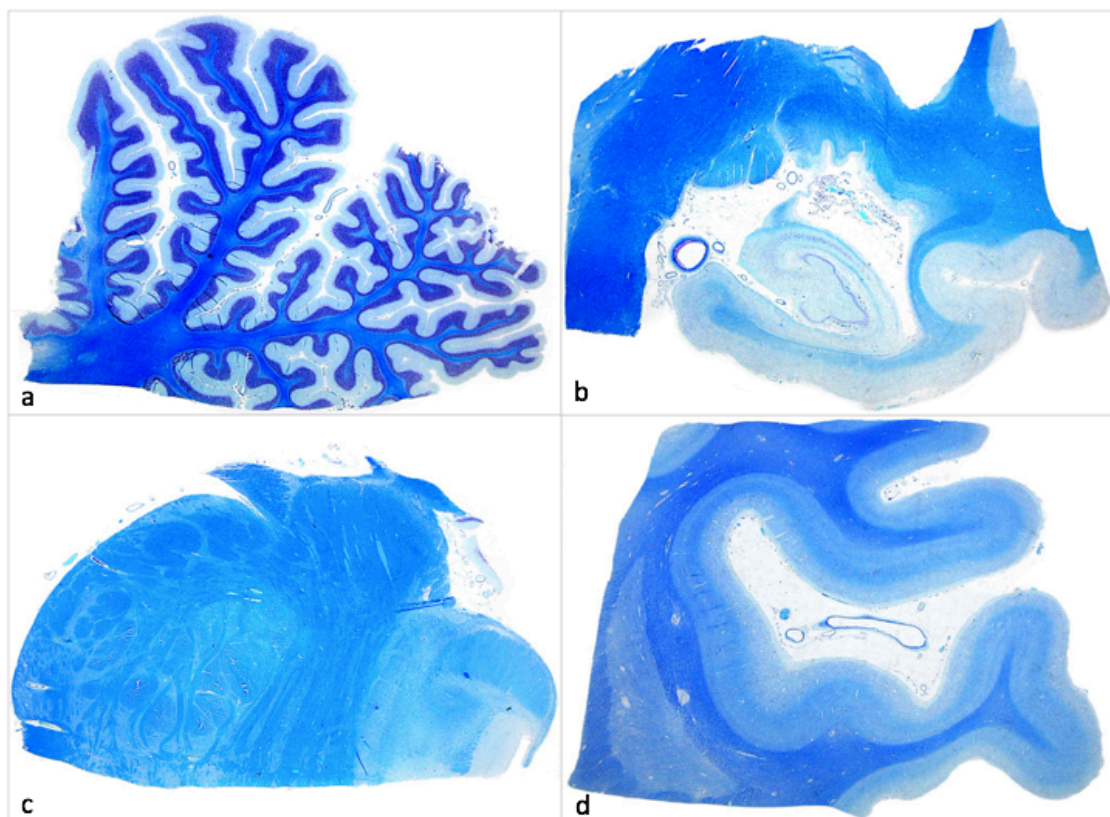


Abbildung 4: Übersichtsdarstellung der untersuchten Hirnregionen.

a: Kleinhirn; b: Hippokampus; c: Hirnstamm (Brücke); d: Okzipitallappen (Marscheidenfärbung Klüver-Barrera)

Da in manchen Fällen die zu untersuchende Region fehlte oder das eingebettete Gehirnmaterial nicht ausreichend war, musste für die Präparate mit der Fallnummer 9, 16, 20 und 21 wiederholt Gewebe aus dem formalinfixierten Gehirn entnommen und eingebettet werden. Alle Präparate konnten anschließend gefärbt

und ausgewertet werden. Einen Überblick über das Patientenkollektiv, eingeteilt in ihre 3 Gruppen, findet sich in **Tabelle 1**.

Tabelle 1: Übersicht über n=28 Patienten eingeteilt in 3 Gruppen nach Braak und Braak, 1991

Gruppe	Fall	Alter	p.m.	Sex	Todesursache	Braak	CERAD
1	1	80	23	m	HerzKreislaufversagen	I	0
1	2	40	40	w	HerzKreislaufversagen	0	0
1	3	62	48	w	Reanimation Hypoxie	I	0
1	4	69	72	m	Bronchopneumonie	0	0
1	5	69	48	m	Aneurysmaruptur (Bauchaorta)	I	B
1	6	51	12,5	w	Linksherzversagen	I	0
1	7	71	24	w	Bronchopneumonie	0	0
1	8	85	20,5	m	Linksherzversagen	I	0
1	9	66	19	m	HerzKreislaufversagen	I	0
2	10	77	24	w	HerzKreislaufversagen	III	B
2	11	78	38	w	Tumorkachexie	IV	0
2	12	75	20	w	HerzKreislaufversagen	IV	B
2	13	85	46	w	Respiratorisches Versagen	III	A
2	14	64	24	m	Arrosionblutung mit Volumenmangelschock	III	0
2	15	86	60,5	w	Volumenangelschock	III	B
2	16	77	28	w	Rhythmogenes Herzversagen	III	k.A.
2	17	62	24	m	Septisches Multiorganversagen	IV	0
3	18	74	26	w	Zentrale Regulationsversagen	V	C
3	19	65	24	w	Bronchopneumonie	V	C
3	20	80	24	w	HerzKreislaufversagen	VI	C
3	21	76	21	w	Aspirationspneumonie	v	C
3	22	63	<24	m	Rechtsbetontes HKV	V	k.A.
3	23	64	12	w	Fulminante Lungenembolie	VI	C
3	24	78	24	m	HerzKreislaufversagen	VI	C
3	25	85	17	w	Rechtsbetontes HKV	V	C
3	26	76	48	m	HerzKreislaufversagen	V	C
3	27	71	12	m	Bronchopneumonie	V	C
3	28	82	24	w	Bronchopneumonie	V	k.A.

0-I= Kontrolle, III-IV= intermediäres AD, V-VI = fortgeschrittenes AD; p.m= postmortem Intervall in Stunden bis zur Fixierung in Formalin, HKV=HerzKreislaufversagen

2.2. Vorbehandlung der Präparate

Den zuvor in 4%iger Formalinlösung fixierten Gehirnen wurden in klinischer Sektion nach dem neuropathologischen Standardprotokoll etwa 2x2 cm große Proben entnommen. Zum Entwässern des Gewebes und zur Aufbereitung der Paraffinblöcke wurden die zugeschnittenen Proben über Nacht in das Vacuum Impression Processor (VIP) Gerät gegeben (Fa. Sakura, Artikelnummer: 6040). Danach wurden die Proben aus dem Paraffin entnommen und zu Paraffinblöcken gegossen. Aus den gekühlten Sektionsblöcken wurden am Mikrotom 4-5 µm dicke Schnitte hergestellt und über ein kurzes Strecken im 36 °C warmen Wasserbad auf die besser haftenden polylysinbeschichteten Super Frost Objektträger (Fa. R. Langenbrink, Germany) aufgezogen. Die fertigen Schnitte trockneten über Nacht bei Raumtemperatur.

Entparaffinierung

Nach Erwärmung der Schnitte auf einer Heizplatte erfolgte die Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe:

- 1) Xylol für 2×10 Minuten
- 2) 100% Ethanol für 5 Minuten
- 3) 96% Ethanol für 5 Minuten
- 4) 70% Ethanol für 5 Minuten
- 5) Aqua dest. für 5 Minuten
- 6) Inkubation in TBS-Puffer pH 7,6 bei 37 Grad für 10 min

2.3 Immunhistochemische Färbung

Für die Identifizierung verschiedener Zelltypen wurden Antikörper-basierte immunhistochemische Färbemethoden verwendet. Hierbei wird mit der Epitop target retrieval Methode die durch Fixierung mit aldehydhaltigem Formalin unzugänglichen Antigene immunhistochemisch freigesetzt. Formaldehyd induziert die Entstehung von Querverbindungen zwischen Aminosäureseitenketten von Proteinen. Auf diese Weise wird ein Ausgangsmolekül soweit denaturiert, dass seine

Bindungsstellen für immunhistochemische Antikörper maskiert werden bzw. verloren gehen.

Die von (Shi et al., 1991) erstmalig beschriebene Methode bricht fixierungsbedingte Aminosäure-Querverbindungen durch Erhitzen der Schnitte in einer Mikrowelle auf Temperaturen von über 100° C auf und setzt Antikörperbindungsstellen für immunhistochemische Färbungen wieder frei. Verwendet wurde hierfür ein handelsüblicher Dampfkochtopf der Marke Silit. Jeweils 10 - 20 Schnitte, zusammen auf einen Ständer gesetzt, werden in einen Einsatz gegeben und vollständig mit Citratpuffer pH 6,0 bedeckt und für 10 Minuten gekocht. Danach lässt man die Präparate 45 Minuten in Pufferlösung abkühlen.

Blocken der endogenen Peroxidase

Das Enzym Peroxidase ist endogen in Erythrozyten und Granulozyten enthalten. In besonders gefäßreichen Abschnitten kann es daher zu Reaktionen mit DAB kommen. Der Primärantikörper wird ebenfalls Peroxidase-abhängig durch das Avidin-Biotin-Konjugat in sein farbiges Endprodukt umgewandelt und kann durch die endogene Peroxidaseaktivität zu falsch positiven Färbeergebnissen führen. Daher ist es sinnvoll die endogene Peroxidase vorher zu blockieren. Dafür werden die Objektträger für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer wasserstoffperoxidhaltigen Lösung (100 ml Aqua dest. und 2,4 ml H₂O₂) inkubiert. Anschließend werden sie gründlich in Aqua dest. gespült und in eine Küvette mit TBS pH 7,6 überführt.

Proteinblock: Blocken unspezifischer Antigene

Kollagenfasern sind geladene Bindegewebsbestandteile und können den verwendeten Antikörpern fälschlicherweise als Bindungsstelle dienen. Damit dies nicht auch zu falsch positiven Ergebnissen führt, müssen die Bestandteile vor Zugabe des Primärantikörpers mit Ziegenserum (10% non immune goat serum, Fa. Invitrogen) geblockt werden. Die Proteinbestandteile des Ziegenserums lagern sich ihrer elektrischen Ladung entsprechend an freie Bindegewebsstrukturen an und geben so den verwendeten Antikörpern keine Möglichkeit zu sich festzusetzen. (Bourne, 1983) Die Objektträger werden mit je 150 µl Ziegenserum

beschichtet und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Serum nicht abgespült, sondern lediglich auf ein Papier abgetropft.

Die Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode

Seitdem die Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Methode, eine indirekte Immunperoxidasefärbetechnik, von (Hsu et al., 1981) beschrieben wurde, ist sie auf Grund ihrer hohen Sensitivität und der guten Durchführbarkeit in histopathologischer Diagnostik und Forschung eine der am häufigsten verwendeten Färbemethoden.

Grundsätzlich beruht die Methode auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der zunächst der Primärantikörper an das im Gewebe befindliche Antigen bindet. Der gegen den Fc-Teil des Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper (Link-Antikörper) bindet wiederum an den Primärantikörper. Durch die Verknüpfung mit einem Biotinmolekül ist der Sekundärantikörper in der Lage eine Verbindung mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Konjugat (Label Enzymkomplex) einzugehen.

Das Verhältnis zwischen dem Peroxidase-Enzym und Antikörper ist bei der indirekten im Vergleich zur direkten Nachweismethode, bei der der Primärantikörper bereits mit dem Peroxidase-Enzym verknüpft ist, höher, so dass es zu einer verstärkten Färbereaktion kommt. Das Avidin des Enzymkonjugats besitzt vier Bindungsstellen. Nur eine ist durch Biotin-Avidin Bindung mit dem Sekundärantikörper besetzt. Die drei freien Bindungsstellen lassen weitere Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplexe binden, die damit die Färbereaktion verstärken.

Um die Antigen-Antikörper Reaktion lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, verwendet man als Substrat für die Peroxidase 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB). Dieses bildet in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid einen Enzym-Substrat Komplex. In der folgenden Redoxreaktion dient es dabei als Elektronendonator. Das DAB wird oxidiert, gibt Elektronen ab und wird an der Stelle der Antigen-Antikörper Reaktion zu einem unlöslichen, braunen Polymer. (Heyderman, 1979; Naish et al., 1989)

Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Während der Inkubation kamen die Schnitte in feuchte Kammern, um ein Austrocknen zwischen den Arbeitsschritten zu vermeiden. Sofern nicht anders beschrieben, wurde bei Raumtemperatur gearbeitet.

Vorbehandlung der Paraffinpräparate vgl. 2.2.

- Den Primärantikörper in die Antikörperverdünnungslösung (gebrauchsfertig, Fa. DCS) pipettieren und mit dem Vortexer-Mixer vermischen.
- Die Schnitte mit je 110 µL der Lösung benetzen (die Negativprobe wird vom Primärantikörper ausgespart und nur mit der Antikörperverdünnungslösung beschichtet)
- Inkubation für 1 Stunde im Brutschrank bei 36° C
- Präparate einzeln mit TBS abwaschen und danach je 2 x 5 Minuten in separaten Küvetten (für die Negativprobe) in TBS spülen (zwischen durch die Lösung wechseln)
- Präparate mit Zellstoff abtupfen, mit jeweils 150 µl Link-Antikörper beschichten (Stravigen-Multilink-Kit der Firma Biogenex) und für 30 Minuten inkubieren
- Präparate nach Ende der Inkubationszeit einzeln mit TBS, sowie anschließend in einer Küvette mit TBS-Lösung für 2 x 5 Minuten spülen
- Präparate dann abtrocknen und mit dem Label-Antikörper beschichten (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, Firma Biogenex)
- Präparate einzeln abspülen und abtrocknen
- Entwicklung mittels DAB: 20 µl Chromogen in 1 ml Substratpuffer lösen (gebrauchsfertig Fa. Dako) und jeden Schnitt für 5 Minuten mit dem Entwickler beschichten. Dann mit TBS und Aqua dest. spülen
- 2 Minuten Kernfärbung mittels Hämalaun
- Anschließend 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen und mit Aqua dest. nachspülen
- In aufsteigender Alkoholreihe entwässern: 70% Ethanol für 2 Minuten
96% Ethanol für 2 Minuten
100% Ethanol für 2 Minuten
Xylol für 2 Minuten

Zuletzt werden die Präparate mit xylohaltigem Histokitt eingedeckt.

Kontrolle

Um die Qualität und Reproduzierbarkeit der immunhistochemischen Färbetechnik zu erhöhen und unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen, lässt man bei jeder Präparatecharge sowohl eine Positiv- als auch Negativkontrolle mitlaufen. Die Positivkontrolle stammt aus einem Gewebe, in dem die zu untersuchenden Epitope ebenfalls vorkommen und sicher angefärbt werden. Mit ihr können nach jeder Charge die Färbemuster der Präparate verglichen werden, um zu sehen, ob die Färbung erfolgreich war.

Als Positivkontrolle dienten für CD68, HLA-DR, CD163, CD206 und CCR2 zwei Glioblastomfälle und ein Fall mit einer entzündlich/entmarkenden Gehirnerkrankung.

Für AT-8 wurde ein Fall mit bekannter Alzheimer-assoziiierter Pathologie als Positivkontrolle verwendet.

Der Negativkontrolle fehlte die Antikörperbeschichtung, ansonsten wurde sie identisch behandelt. Mit ihr lässt sich kontrollieren, ob das verwendete Detektionskitt unspezifische Hintergrundreaktionen verursacht.

2.4 Verwendete Antikörper und Reagenzien

Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen

1. **CD68**-Antikörper, Klon EBM11 (monoklonaler Mausantikörper) der Firma Dako (Best.Nr. M0728 Fa. Dako, Denmark) in einer Verdünnung von 1:100
2. **HLA-DR**-Antikörper, Klone TAL.1B5 (monoklonaler Mausantikörper) der Firma DakoCytomation (Best.Nr. M0746 Fa DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:80
3. **CD163**-Antikörper, Klon 10D6 (monoklonaler Mausantikörper) der Firma Novocastra (Best.Nr. NCL-CD163 Fa. Novocastra, Leica Biosystems, UK) in einer Verdünnung von 1:100

4. **CD206**-Antikörper, Klon 5C11 (monoklonaler Mausantikörper) der Firma BIO-RAD (Best.Nr. MCA5552Z Fa. BIO-RAD, Hercules, California, USA) in einer Verdünnung von 1:500

5. **CCR2**-Antikörper, Klon 7A7 (monoklonaler Mausantikörper) der Firma Abcam (Best.-Nr. ab176390 Fa. abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:800

6. **Phospho-Tau-Antikörper**, Klon AT-8 (monoklonaler Mausantikörper) der Firma Thermo Fisher Scientific (Best.-Nr. MN1020 Fa. ThermoFisher, Waltham, USA) in einer Verdünnung von 1:200.

Verwendete Materialien, Reagenzien und Detektionskits

- a) Formalinhaltige Fixationslösung (4%) (Fa. Brüggemann, Heilbronn)
- b) Superfrost-Objektträger (Fa. R. Langenbrink, Germany)
- c) TBS-Lösung mit dem pH 7,6 zum Spülen.

Herstellung der Stammlösung: 121,1 g Tris (Best.-Nr. 1086 Fa. AppliChem) und 169,4 g NaCl (Best.-Nr. 3597 Fa. AppliChem) werden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst. Dann wird 100 ml 25% HCl (Best.-Nr. 0658 Fa. AppliChem) hinzugefügt und das Volumen auf 2000 ml mit der nötigen Menge an Aqua bidest. aufgefüllt. Schließlich erfolgt die Einstellung des pH-Wertes auf den Wert 7,6. Die Stammlösung wird kurz vor Gebrauch mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:10 verdünnt. (100 ml Stammlösung auf 900 ml Aqua bidest.)

- d) Während des „epitope target retrievals“ kommt ein Citratpuffer pH 6,0 als Kochpuffer im Dampfdruckkochtopf (Fa. Silit) zum Einsatz

Herstellung: 5,1 g NaOH-Plätzchen (Best.-Nr. 1.06498 Fa. Merck) werden in einem Liter Aqua dest. gelöst und dann 10,5 g Zitronensäure-Monohydrat (Best.-Nr. 1350 Fa. AppliChem) hinzugefügt. Die Lösung wird auf 2500 ml mit der dazu nötigen Menge an Aqua dest. aufgefüllt und der pH auf 6,0 eingestellt.

- e) Für das Blocken der endogenen Peroxidase werden 2,4 ml 30 % H₂O₂ (Best.-Nr. 1134 Fa. AppliChem), in 100 ml Aqua dest. gelöst.
- f) Als Proteinblock dient Ziegenserum (10% ready to use, non immune goat serum, Bestell-Nr. 50-062Z Fa. Invitrogen).
- g) Die Verdünnung des Primärantikörpers erfolgt mit gebrauchsfertiger Antikörperverdünnungspufferlösung (Best.-Nr. ALI20R100 Fa. DCS)
- h) Das Link-Kit enthält ein Diluent (Best.-Nr. HK165-5KE Fa. Biogenex) und einen biotinilierten Multi-Link-Antikörper (Best.-Nr. HK268-UKE Fa. Biogenex), das Label-Kit ebenfalls ein Diluent (Best.-Nr. HK157-5KE, Fa. Biogenex) und einen Peroxidase-konjugierten Streptavidin-Label-Antikörper (Best.-Nr. HK320-UKE Fa. Biogenex). Die jeweilige Verdünnung wurde gemäß den Angaben des Herstellers (1ml Antikörper auf 100 ml Diluent) hergestellt.
- i) Für die Entwicklung der Schnitte wurde DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) verwendet. Hierfür wird ein Kit, bestehend aus DAB + Chromogen und DAB + Substratpuffer genutzt (Best.-Nr. K3468 Fa. DAKO). Aufgrund der Instabilität des DABs darf die Lösung erst kurz vor der Anwendung angesetzt werden: 1 Tropfen (20 µl) DAB-Chromogen wird in 1 ml Substratpuffer gelöst.
- j) Die Kernfärbung erfolgt mittels Hämalaun.
Ansetzen Hämalaun nach Meyer: 1,2 g Hämatoxylin (Best.-Nr. 3816.2 Fa. Roth), 0,2 g Natriumjodat (Best.-Nr. 106525 Fa. Merck), 50 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat (Best.-Nr. 101042 Fa. Merck), 50 g Chloralhydrat (Best.-Nr. 102425 Fa. Merck) und 1 g Zitronensäure (Best.-Nr. 100244 Fa. Merck) nacheinander in einigen Millilitern Aqua dest. auflösen und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen. Die Lösung über Nacht auf ein Magnetrührgerät stellen. Das Behältnis anschließend abdecken und vor der Benutzung etwa 4 Wochen reifen lassen.
- k) Xylohaltiges Eindeckmittel: Histokitt (Best.-Nr. 1025 Fa. Glaswarenfirma Karl Hecht)
Verwendete Chemikalien zum Adjustieren des pH- Wertes der Pufferlösungen: 2 molarige HCl (Best.-Nr. 2533 Fa. AppliChem), 1 molarige HCl

(Best.-Nr. 1434 Fa. AppliChem), 2 molariges NaOH (Best.-Nr. 2518 Fa. AppliChem), 1 molariges NaOH (Best.-Nr. 1.09137 Fa. Merck)

2.5 Auswertung der Färbeergebnisse

Die Auswertung der gefärbten Präparate hinsichtlich der verschiedenen Mikroglia-Zellpopulationen (CD68, CD163, CD206, HLA-DR, CCR2) und Tau-Fibrillen (AT-8), erfolgte mikroskopisch in 20-facher Vergrößerung und einer am Mikroskop (Olympus BX508) verbundenen Kamera (Olympus DP27). Für jeden Antikörper wurden 10 randomisierte Fotos pro Objektträger angefertigt, um eine möglichst große und für den ganzen Schnitt repräsentative Fläche zu erhalten. Die Fläche der 10 Bilder zusammen beträgt 10,34 mm². Die Auszählung der im Cortex liegenden braun gefärbten Mikroglia erfolgte unter Verblindung, also ohne Kenntnis der Schweregradeinteilung.

Mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogrammes (Software Biomas, Universitätsklinik Erlangen, Abteilung für Strahlentherapie) wurden die Färbeergebnisse quantitativ ausgewertet. Für jede Antikörperfärbung wurden vor der Auszählung zellmorphologische Parameter, wie Größe und Färbeintensität, ab der eine Zelle als positiv zu werten ist, festgelegt und während des Durchlaufs nicht verändert. Das Programm überschrieb die Daten automatisch in eine eigens dafür erstellte Excel-Makro. Die Anzahl der in den 10 fotografierten Gesichtsfeldern sichtbaren Mikrogliazellen wurde mit der Fläche verrechnet und in Anzahl/mm² gespeichert. Auf diese Weise wurden insgesamt 8400 Aufnahmen ausgewertet.

2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde die Software SPSS verwendet. Die Daten der unterschiedlichen Gruppen und Gehirnregionen wurde mittels ein-, beziehungsweise univariaten Varianzanalyse (ANOVA) und dem Post-hoc-Test nach Bonferoni analysiert. Für die Verhältnisanalyse der HLA-DR, CD163 und CD206 Mikrogliapopulationen wurde ebenfalls eine ANOVA und der Post-hoc-Test nach Bonferoni angewandt. Für das Signifikanzniveau wurden p-Werte < 0.05 als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Demographische Daten des untersuchten Patientenkollektivs

Untersucht wurden 28 Patienten, eingeteilt in drei Gruppen: die Kontrollgruppe enthielt 9, die intermediäre AD 8 und die fortgeschrittene AD 11 Patienten. In **Tabelle 2** sind die demographischen Daten der Fälle zusammengefasst.

Tabelle 2: Demographische Daten der untersuchten Fälle.

	Gesamt	Kontrolle Braak 0-I	interm.AD Braak III-IV	fortg.AD Braak V-VI
Geschlecht (m/w)	11/17	5/4	2/6	4/7
Alter (Jahre ± SD)	72.1 ± 10.9	65.9 ± 13.8	75.5 ± 8.7*	74.6 ± 7.9*
PMI (Stunden ± SD)	29.5 ± 15.9	34.1 ± 19.2	33.1 ± 14.1	23.2 ± 9.5 °
Braak (Stadium ± SD)	3.3 ± 1.9	0.7 ± 0.3	3.4 ± 0.5	5.4 ± 0.6

PMI = postmortem 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 Bonferoni, *p < 0.05 versus Kontrolle, ° p < 0.05 versus interm. AD

Das Alter der untersuchten AD Patienten lag zwischen 62 und 86 vollendeten Jahren. Das mittlere Patientenalter betrug 72 Jahre, der Altersmedian 74.5 Jahre, mit einem 68%-Konfidenzintervall von 69,4 bis 73.9 Jahren. Von den 28 Patienten waren 17 weiblich (61%) und 11 männlich (39%). Bezüglich des Alters fanden sich signifikante Zusammenhänge zwischen der intermediären AD (75.5 ± 8.7 Jahre) und Kontrolle (65.9 ± 13.8 Jahre) (p= 0.02), sowie der fortgeschrittenen AD (74.6 ± 7.9 Jahre) und der Kontrollgruppe (p=0.04)

Das postmortem Intervall der fortgeschrittenen AD Fälle war mit 23.2 Stunden im Vergleich zur Kontrolle (34.1 Stunden) und intermed. AD (33.1 Stunden) signifikant kürzer (p=0.03)

3.2 Verteilung der Mikrogliapopulationen nach Regionen in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Nach entsprechender Aufbereitung der Gehirnproben wurden mit immunhistochemischen Färbungen die CD68+, HLA-DR+, CD163+, CD206+ und CCR2+ Mikrogliapopulationen nachgewiesen und quantifiziert. Zur Darstellung AD erkrankter Neurone (NFTs) diente die Färbung mit AT-8.

Das Kleinhirn verzeichnete in allen Färbungen eine sehr geringe Dichte an positiven Zellen mit den jeweiligen Markern. Zwischen den Stadien unterlag die Zelldichte auch keiner wesentlichen Schwankung. Deshalb wurde im Folgenden auf eine genauere Analyse verzichtet.

3.2.1 CD68

Die Färbung für CD68 konnte für alle 28 Fälle durchgeführt werden. Bis auf den Hippokampus des Falls 28 war ausreichend Material für die Auswertung vorhanden.

In der Kontrollgruppe sind die ruhenden, ramifiziert erscheinenden CD68+ Zellen in niedriger Anzahl disseminiert im Gewebe zu finden. Im Vergleich dazu lassen sich in der intermediären und fortgeschrittenen AD ein Anstieg der Zellzahl mit teilweiser Ausbildung von kleinen Zellansammlungen (Haufen) um AD-typische Läsionen erkennen. Morphologisch erscheinen die Zellkörper, insbesondere in der fortgeschrittenen AD, vergrößert und abgerundet und mit weniger Zellfortsätzen.

Die Färbeergebnisse sind exemplarisch an der Hippokampusregion in **Abbildung 5** dargestellt, die tabellarische Zusammenfassung der Anzahl CD68+ Zellen in **Tabelle 3**.

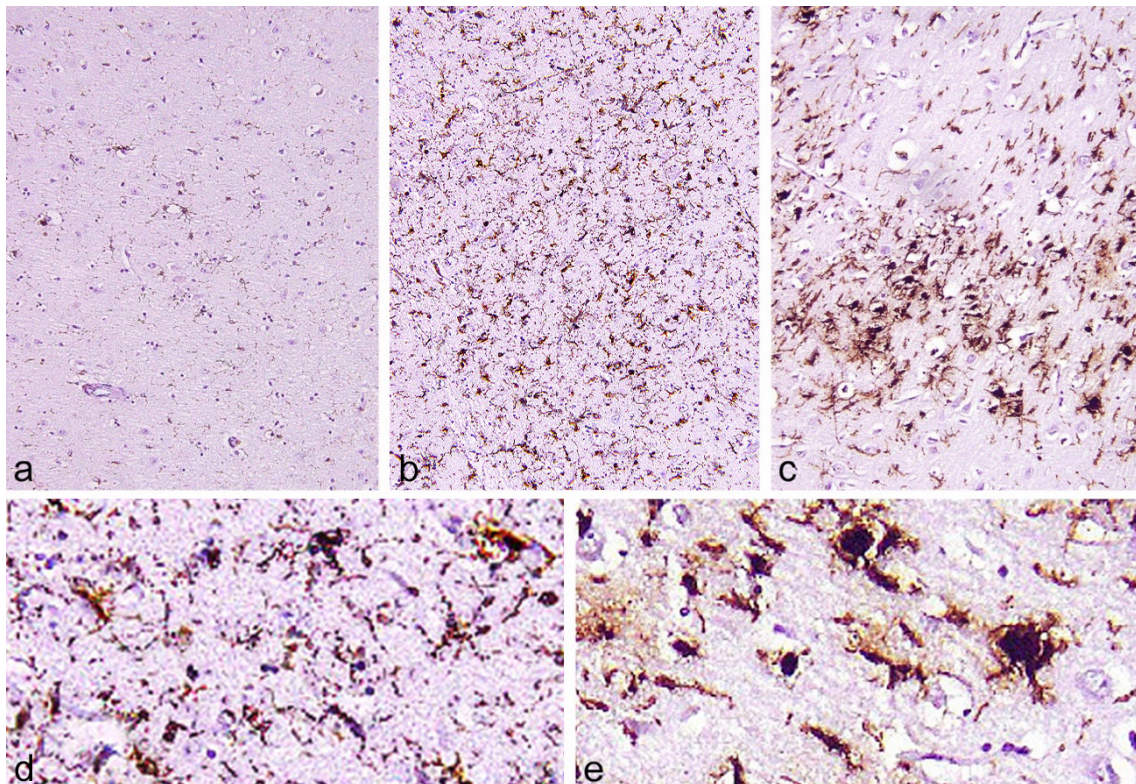


Abbildung 5: Aufnahmen aus dem Hippokampus (HC) für die Färbung mit CD68 (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung a-c: 200-fach. In Abbildung d und e: 400-fach vergrößerte Darstellung der Morphologie CD68+ Zellen in der intermediären AD (d) bzw. fortgeschrittenen AD (e).

Tabelle 3: Tabellarische Zusammenfassung CD68+ Zellen.

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
OL	260.6 ± 121.9	146.8 ± 45.8*	269.0 ± 88.9	347.7 ± 113.3
HC	435.7 ± 239.5	208.2 ± 103.4*	547.7 ± 214.4	545.4 ± 205.2
KH	51.7 ± 20.7	39.6 ± 10.9	59.7 ± 23.9	55.9 ± 21.3
HS	557.3 ± 199.6	435.1 ± 90.9	496.6 ± 197.7	701.4 ± 185.3°

Angaben in Zellen/mm² Mittelwert ± Standardabweichung; OL= Okzipitallappen; HC= Hippokampus, HS= Hirnstamm, KH= Kleinhirn; interm. AD= intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD= fortgeschrittene Alzheimer Demenz; *p < 0.05 versus fortg. AD, °p < 0.05 versus Kontrolle und intermed. AD, Die signifikanten Unterschiede (p<0.05) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.1.1 Vergleich CD68+ Mikroglia innerhalb der Regionen

Im **Okzipitallappen (OL)** lag die minimale Zelldichte intrakortikaler CD68+ Zellen bei 76 Zellen/mm², die maximale bei 471 Zellen/mm². In der Kontrollgruppe betrug der Mittelwert M=146.8 Zellen/mm² und die Standardabweichung SD±43.2

Zellen/mm². Im Verlauf stieg die Zelldichte der CD68+ Mikroglia von der Kontrollgruppe (M=146.8; SD±45.8) zur Gruppe der intermed. AD (M=269.0; SD±88.9) signifikant an (p=0.03), gefolgt von einer weiteren nicht signifikanten Zunahme der CD68+ Mikroglia von der intermed. AD zur fortg. AD Gruppe (M=347.7; SD±113.3). Die Kontrollgruppe ist gegenüber der fortg. AD höchst signifikant zellärmer (p < 0.001).

Die minimale Zelldichte der CD68+ Mikroglia im **Hippokampus (HC)** betrug 73 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe) und die maximale 1002 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Die Zelldichte der CD68+ Mikroglia in der Kontrollgruppe (M=208.2; SD± 103.4) nahm zu der intermed. AD (M=547.7; SD±214.4) höchst signifikant zu (p < 0.001). Zwischen intermed. und fortg. AD blieb die Zelldichte der CD68+ Mikroglia im HC mit einem Mittelwert von M=545.4 und einer Standardabweichung von SD± 205.2 Zellen/mm² nahezu konstant. Die Kontrollgruppe ist gegenüber der fortg. AD höchst signifikant zellärmer (p < 0.001).

Die minimale Zelldichte der CD68+ Mikroglia im **Hirnstamm (HS)** ergab 266 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe), die maximale 911 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Im HS nahm die Zelldichte der CD68+ Mikroglia von der Kontrollgruppe (M=435.1; SD± 90.9) zur intermed. AD (M=496.6; SD±197.7) leicht zu und verstärkte sich von der intermed. AD zum fortg. AD (M=701.4; SD±185.3) signifikant (p=0.04). Die Kontrollgruppe ist signifikant zellärmer als die fortg. AD (p=0.004).

Abbildung 6 enthält die grafische Darstellung der Verteilung CD68+ Mikroglia in den untersuchten Regionen im Krankheitsverlauf.

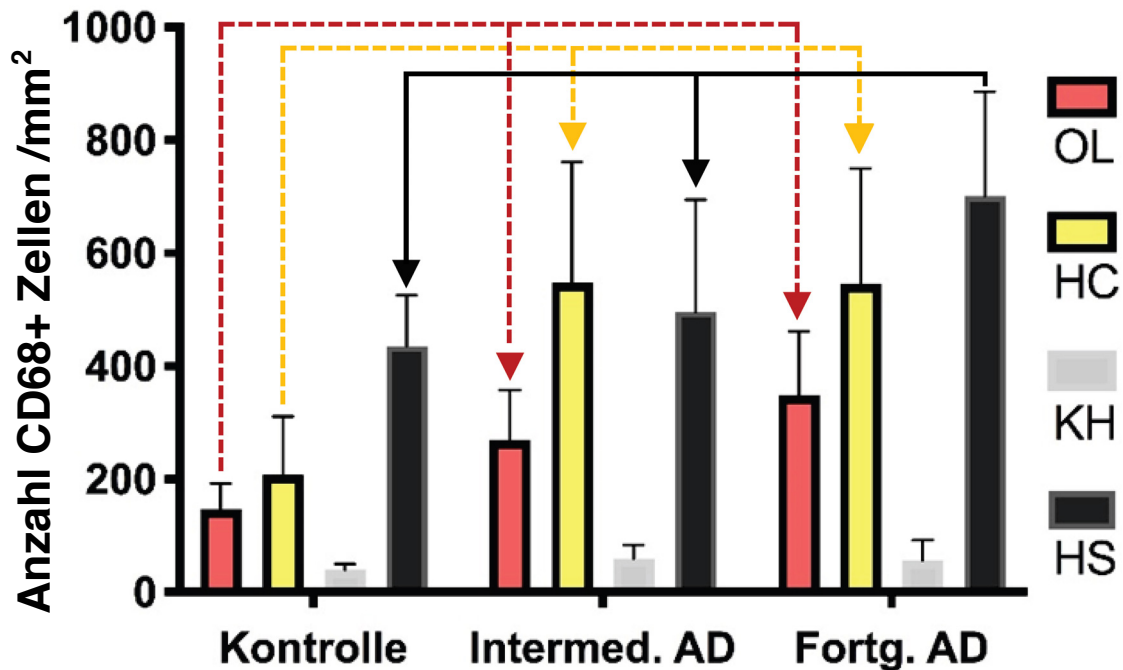


Abbildung 6: Balkendiagramm der CD68+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus (HC), Kleinhirn (KH) und Hirnstamm (HS) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD). Die Balken zeigen die Mittelwerte der CD68+ Zellen/mm², Whiskers die Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$), dargestellt durch die Pfeile, basieren auf der statistischen Analyse mittels A-NOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.1.2 Vergleich CD68+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums

Vergleicht man die Zelldichten der CD68+ Mikroglia der untersuchten Regionen innerhalb einer Gruppe, so ist die **Kontrollgruppe** des Hirnstamms höchst signifikant zellreicher als die Kontrollgruppen der anderen Regionen ($p < 0.001$). Zudem sind die Kontrollgruppen des OL und HC signifikant zellreicher als die Kontrollgruppe des KH ($p = 0,04$; $p < 0.001$)

In der **intermed. AD** stellte sich der Hippokampus gegenüber dem Kleinhirn (KH) und dem Okzipitallappen (OL) mit signifikant höherer Zelldichte dar ($p < 0.001$; $p = 0.01$). Der HS war ebenfalls gegenüber dem KH höchst signifikant ($p < 0.001$) zellreicher.

Innerhalb des **fortg. AD** Stadiums waren die Zelldichten des HS und HC gegenüber dem KH und OL höchst signifikant höher ($p < 0.001$ für HS vs. OL und KH; $p = 0.01$ für HC vs. OL; $p < 0.001$ für HC vs. KH).

Wird die Gesamtzahl aller CD68+ Zellen der **unterschiedlichen Regionen, ungeachtet der AD Progression**, über alle Stadien hinweg miteinander verglichen, so ist der HS (M=557.3; SD±199,6) die Region mit der signifikant zellreichsten CD68 Population und zeigt gegenüber dem HC (M=435.7; SD± 113.3; p=0.03), OL (M=260.6; SD±121.9; p<0.001) und KH (M=57.1; SD±28.1; p<0.001) die signifikant höchste Zelldichte. Des Weiteren ist der HC höchst signifikant zellreicher als der OL und das KH (p<0.001). Wobei der OL wiederum höchst signifikant zellreicher ist als das KH (p<0.001).

3.2.2 HLA-DR

Um die Verteilung der Mikroglia Subpopulationen mit der Progression der AD zu korrelieren, wurden die Mikrogliazellen aus den vier unterschiedlichen Regionen, mit verschiedener Vulnerabilität gegenüber AD, mit den Markern für HLA-DR, CD163 und CD206 gefärbt.

Die Färbung für HLA-DR konnte für alle 28 Fälle durchgeführt werden, mit Ausnahme des HC des Falls 23.

Die Färbeergebnisse für HLA-DR sind exemplarisch an der Hippokampusregion in **Abbildung 7** dargestellt.

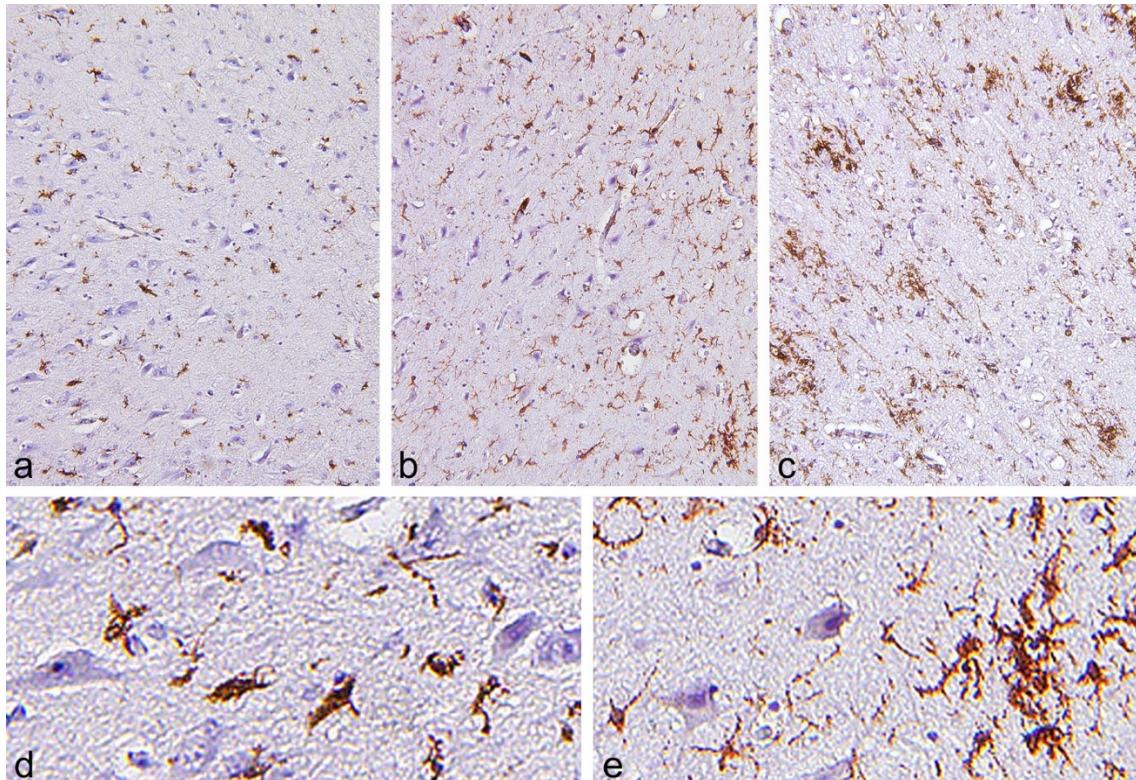


Abbildung 7: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit HLA-DR (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung a-c: 200-fach. In Abbildung d und e: 400-fach vergrößerte Darstellung der Morphologie HLA-DR+ Zellen in der intermediären AD (d) bzw. fortgeschrittenen AD (e).

Die Aufnahme (a) stellt einen Ausschnitt aus der Kontrollgruppe mit insgesamt niedriger Anzahl an gleichmäßig im Schnitt verteilten HLA-DR+ Zellen dar. Im Vergleich dazu zeigt sich in der intermed. AD (b) und fortg. AD (c) eine Vermehrung der Zellen mit der Tendenz um die Alzheimer-typischen Veränderungen kleine Haufen zu bilden.

Tabelle 4: Zelldichte (Zellen/mm²) für HLA-DR+ Mikroglia innerhalb der drei Gruppen (Kontroll-, intermed. AD- und fortg. AD- Gruppe) in den untersuchten Hirnregionen.

Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung HLA-DR+ Zellen

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
OL	227.7 ± 146.3	87.5 ± 52.4*	225.1 ± 89.1	344.27 ± 121.8
HC	438.2 ± 259.8	200.1 ± 119.7*	498.8 ± 234.0	596.2 ± 221.0
KH	44.8 ± 21.8	35.4 ± 15.3	46.25 ± 14.44	51.4 ± 26.6
HS	507.4 ± 228.9	327.9 ± 90.9*	581.6 ± 173.4	600.4 ± 246.9

Angaben in Zellen/mm² Mittelwert ± Standardabweichung; OL= Okzipitallappen; HC= Hippokampus, HS= Hirnstamm, KH= Kleinhirn; interm. AD= intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD= fortgeschrittene Alzheimer Demenz; *p < 0.05 versus fortg. AD; Die signifikanten Unterschiede (*p<0.05) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.2.1 Vergleich HLA-DR+ Mikroglia innerhalb der Regionen

Für den **Okzipitallappen (OL)** betrug die minimale Zelldichte intrakortikaler HLA-DR+ Zellen 32 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe), die maximale 548 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Die Kontrollgruppe des OL hatte einen Mittelwert von M=87.5 Zellen/mm² mit einer Standardabweichung von SD=52.4 Zellen/mm². Im Verlauf stieg die Zelldichte der HLA-DR+ Mikroglia von der Kontrollgruppe zur intermed. AD (M=225.1; SD±89.1) signifikant an (p=0.03), gefolgt von einer weiteren nicht signifikanten Zunahme in der fortg. AD (M=344.3; SD±121.8). Die Kontrollgruppe des OL ist höchst signifikant zellärmer als die fortg. AD, (p<0.001).

Die minimale Zelldichte HLA-DR+ Mikroglia im **Hippokampus (HC)** lag bei 29 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe) und die maximale bei 1169 Zellen/mm² (aus der intermed. AD). Die Zelldichte der HLA-DR+ Mikroglia stieg im HC von der Kontrollgruppe (M=200.1; SD±119.7) zur der intermed. AD (M=498.8; SD±234.0) signifikant an (p=0.02). Des Weiteren war ein nicht signifikanter Anstieg der Zelldichte von intermed. zur fortg. AD (M=596.2; SD± 221.0) bemerkbar. Die Kontrolle des HC verglichen mit der fortg. AD war höchst signifikant zellärmer (p<0.001).

Die minimale Zelldichte der HLA-DR+ Mikroglia im **Hirnstamm (HS)** lag bei 69 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe), die maximale bei 944 Zellen/mm² (aus der

fortg. AD). Im HS stieg die Zelldichte der HLA-DR+ Mikroglia von der Kontrollgruppe (M=327.9; SD±90.9) zur intermed. AD (M=581.6; SD±173.4) signifikant an (p=0.04) und blieb im fortg. AD (M=600.4; SD± 246.9) annähernd konstant. Die HS Kontrollgruppe ist signifikant zellärmer als die fortg. AD (p=0.02).

Abbildung 8 enthält die grafische Darstellung der Verteilung HLA-DR+ Mikroglia in den untersuchten Regionen im Krankheitsverlauf.

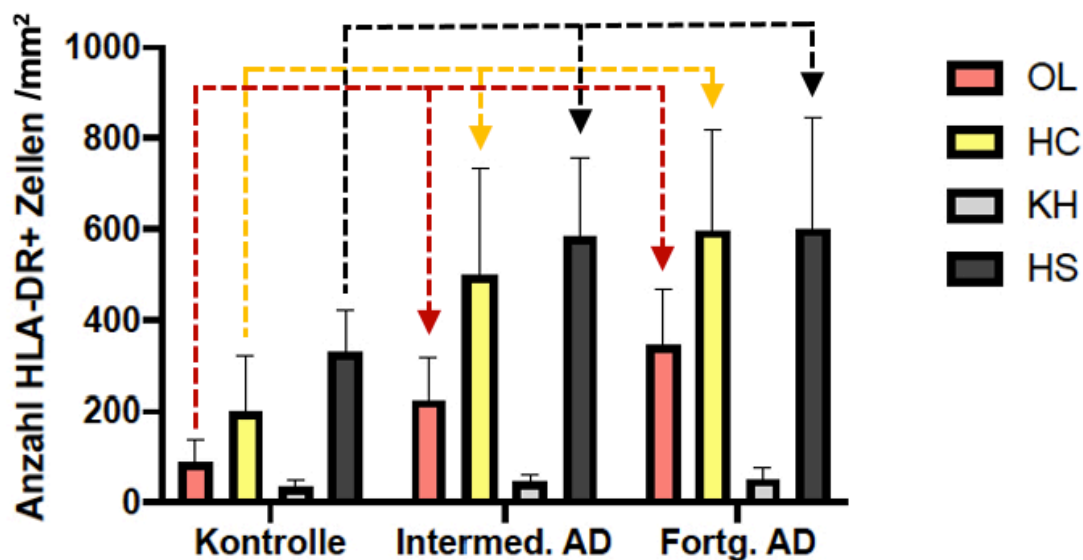


Abbildung 8: Balkendiagramm der HLA-DR+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus (HC), Kleinhirn (KH) und Hirnstamm (HS) von Kontrollgruppe, intermed. AD und fortg. AD. Die Balken zeigen die Mittelwerte der Zellen/mm², Whiskers die Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede (p < 0.05), dargestellt durch die Pfeile, basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.2.2 Vergleich HLA-DR+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums

Werden die Zelldichten der HLA-DR+ Mikroglia der untersuchten Regionen innerhalb eines Stadiums miteinander verglichen, so zeigte der HS innerhalb der **Kontrollgruppe** die signifikant höchste Zelldichte HLA-DR+ Mikroglia gegenüber den anderen Regionen (p<0.001 für HS vs. OL und KH; p=0.01 für HS vs. HC). Die Zelldichte der HLA-DR+ Mikroglia in der Kontrollgruppe des HC war zudem signifikant zellreicher als die Kontrollgruppen des OL und des KH (p=0.03; p < 0.001).

Innerhalb der **Gruppe der intermed. AD** waren die Regionen des HC und HS signifikant zellreicher an HLA-DR+ Mikroglia als die des OL und KH ($p=0.01$ für HC vs. OL; $p=0.003$ für HS vs. OL; $p<0.001$ für HC und HS vs. KH).

Ein ähnliches Verhältnis ließ sich in der **Gruppe der fortg. AD** nachweisen. Innerhalb dieses Stadiums waren der HC und der HS gegenüber dem OL mit einem Signifikanzniveau von $p=0.01$ (HC) und $p=0,02$ (HS) zellreicher. Außerdem waren HC und HS im Vergleich zum KH höchst signifikant zellreicher ($p<0.001$).

Wird **die Gesamtzahl** aller HLA-DR+ Zellen der unterschiedlichen Regionen, **ungeachtet der AD Progression**, über alle Stadien hinweg miteinander verglichen, so bestehen zwischen den beiden zellreichsten Regionen, dem HS ($M=507.3$; $SD\pm 228.9$) und dem HC ($M=438.2$; $SD\pm 259.8$), kein signifikanter Zusammenhang. Im Vergleich zum OL ($M=227.7$; $SD\pm 146.3$) und KH ($M=44.8$; $SD\pm 21.8$) waren beide Regionen höchst signifikant zellreicher ($p < 0.001$). Der OL war zudem marginal signifikant zellreicher als das KH ($p=0.06$)

3.2.3 CD163

Die Färbeergebnisse für CD163 sind exemplarisch an der Hippokampusregion in **Abbildung 9** dargestellt. Auch hier kann eine Zunahme der Anzahl an positiven CD163 Zellen zwischen der Kontrollgruppe (links) der interm. AD und der fortg. AD beobachtet werden, sowie eine Tendenz zur Ausbildung kleiner Zellhaufen in den fortgeschrittenen Stadien (rechts).

Die Färbung für CD163 konnte für alle 28 Fälle durchgeführt werden, mit Ausnahme des OL des Falls 14.

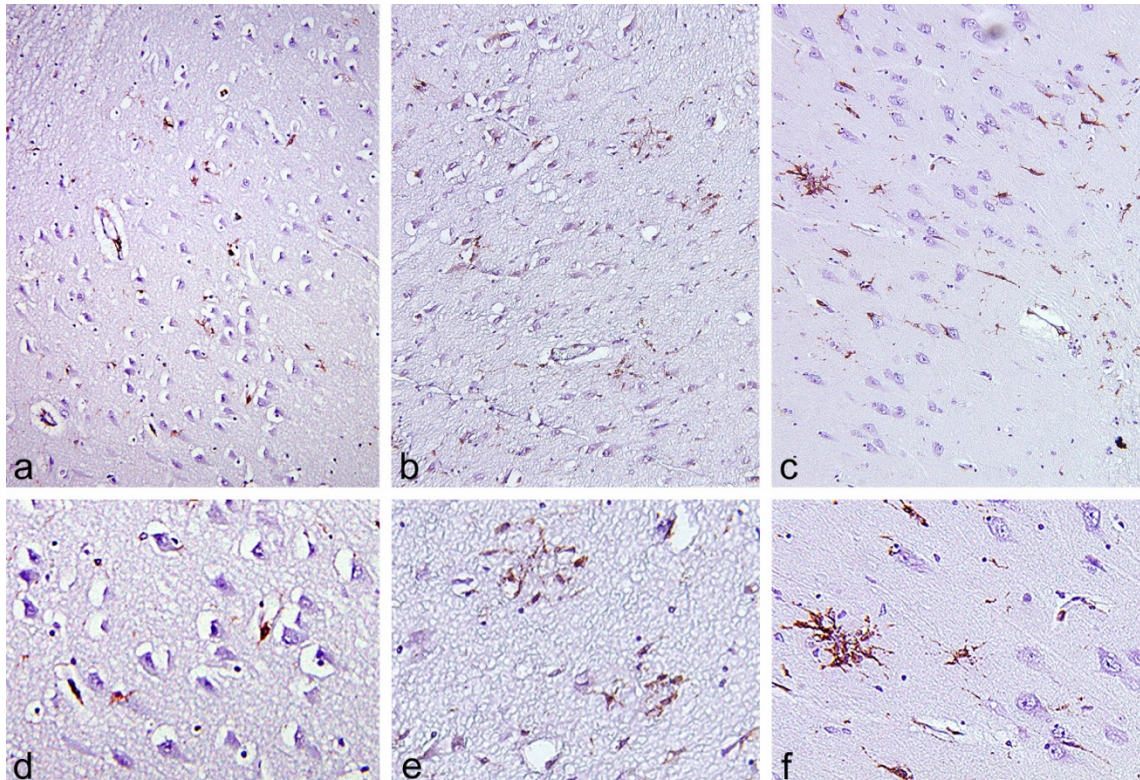


Abbildung 9: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit CD163 (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung a-c: 200-fach. In Abbildung d-f: 400-fach vergrößerte Darstellung der Morphologie CD163+ Zellen in der Kontrollgruppe (d) intermediären AD (e) bzw. fortgeschrittenen AD (f).

Tabelle 5: Zelldichte (Zellen/mm²) der CD163+ Mikroglia innerhalb der drei Gruppen (Kontroll-, intermed. AD- und fortg. AD- Gruppe) in den untersuchten Hirnregionen.

Tabelle 5: Tabellarische Zusammenfassung CD163+ Zellen

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
OL	98.6 ± 87.3	55.2 ± 51.8	83.0 ± 60.7	144.1 ± 98.5
HC	89.6 ± 74.5	65.2 ± 57.2	71.4 ± 53.7	117.7 ± 87.5
KH	10.8 ± 6.9	8.7 ± 2.6	9.5 ± 5.8	13.6 ± 8.6
HS	119.7 ± 88.0	87.6 ± 66.8	105.6 ± 40.5	155.0 ± 106.7

Angaben in Zellen/mm² Mittelwert ± Standardabweichung; OL= Okzipitallappen; HC= Hippokampus, HS= Hirnstamm, KH= Kleinhirn; interm. AD= intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD= fortgeschrittene Alzheimer Demenz; keine signifikanten Unterschiede nach der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.3.1 Vergleich CD163+ Mikroglia innerhalb der Regionen

Im **Okzipitallappen (OL)** beträgt die minimale Zelldichte intrakortikaler CD163+ Mikrogliazellen 18 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe) und die maximale 375 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). In der Kontrollgruppe des OL betrug der Mittelwert $M=55.2$ Zellen/mm² und die Standardabweichung $SD\pm 51.8$ Zellen/mm². Im Verlauf verzeichnete sich von der Kontrollgruppe zu der Gruppe der intermediären AD ($M=83.0$; $SD\pm 60.7$) ein Anstieg der Zelldichte CD163+ Mikroglia, gefolgt von einer weiteren Zunahme der Zelldichte CD163+ Mikroglia in der fortgeschrittenen AD Gruppe ($M=144.1$; $SD\pm 98.5$).

Die minimale Zelldichte der CD163+ Mikroglia im **Hippokampus (HC)** liegt bei 20 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe) und die maximale bei 398 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Die Zelldichte der CD163+ Mikroglia in der HC Kontrollgruppe ($M=65.2$; $SD\pm 57.2$) ist geringer als in der intermed. AD ($M=71.4$; $SD\pm 53.7$). Die Zelldichte der CD163+ Mikroglia in der intermed. AD ist wiederum geringer als in der fortg. AD ($M=117.7$ $SD\pm 87.5$).

Im **Hirnstamm (HS)** lag die minimale Zelldichte CD163+ Mikroglia bei 30 Zellen/mm², einem Wert aus der intermed. AD, und der Maximalwert bei 419 Zellen/mm² (fortg. AD). Im HS stieg die Zelldichte der CD163+ Mikroglia von der Kontrollgruppe (87.6 ± 66.8) zur intermediären AD (105.6 ± 40.5) und von dort zur fortgeschrittenen AD (155.0 ± 106.7) an.

Abbildung 10 enthält die grafische Darstellung der Verteilung CD163+ Mikroglia in den untersuchten Regionen im Krankheitsverlauf.

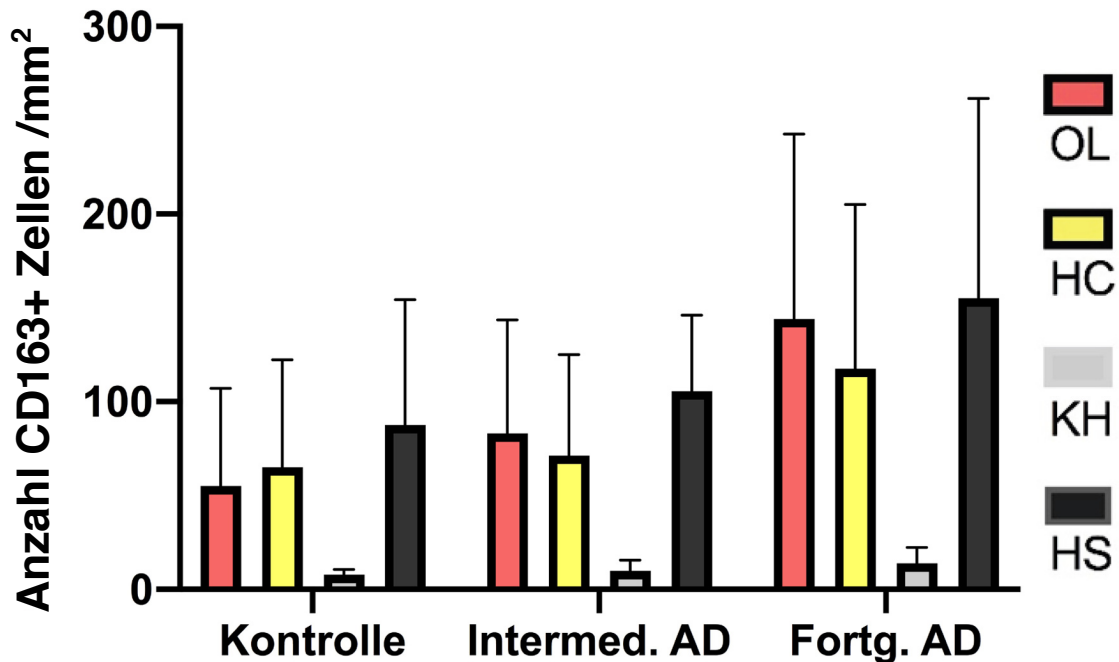


Abbildung 10: Balkendiagramm der CD163+ Mikroglia im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermed. AD und fortg. AD. Die Balken zeigen die Mittelwerte der positiven Zellen/mm², Whiskers die Standardabweichung

3.2.3.2 Vergleich CD163+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums

Werden die Zelldichten der untersuchten Regionen innerhalb eines Stadiums miteinander verglichen, so ist das KH (M=8.7; SD± 2.6) innerhalb der **Kontrollgruppe**, gegenüber dem HS signifikant ($p = 0.02$) zellärmer. Weitere statistische Zusammenhänge zwischen den Regionen wurden innerhalb der Kontrollgruppe nicht festgestellt.

In der **intermed. AD** ist das KH ebenfalls signifikant zellärmer als der HC ($p=0.04$) und der HS ($p=0.05$) und knapp nicht signifikant zellärmer im Vergleich mit dem OL ($p=0.05$).

In der **fortg. AD** stellte sich das KH gegenüber allen anderen Regionen signifikant zellärmer dar (OL: $p=0.01$; HC: $p=0.01$; HS: $p=0.003$).

Wird die **Gesamtzahl** aller CD163+ Zellen der unterschiedlichen Regionen, **ungeachtet der AD Progression**, über alle Stadien hinweg miteinander verglichen, so ist diese für das KH (M=57.1; SD± 28.1) höchst signifikant niedriger als die

der anderen Regionen ($p < 0.001$). Des Weiteren fand sich im HS die größte Zelldichte CD163+ Mikroglia (119.7 ± 88.0), gefolgt vom OL (98.6 ± 87.3) und dem HC (89.6 ± 74.5).

3.2.4 CD206

Im Folgenden sind in **Abbildung 11** drei Bilder der CD206 Färbung aus dem Hippokampus exemplarisch dargestellt. Hierbei zeigt sich, besonders im Vergleich mit zu den anderen Färbungen, eine insgesamt niedrigere Anzahl an positiven Zellen. Die CD206+ Zellen sind dabei vor allem perivaskulär und nur vereinzelt intraparenchymatös gelegen.

Die Färbung für CD 206 konnte für alle 28 Fälle durchgeführt werden, mit Ausnahme des HC (Fall 14 und 18), OL (Fall 18) und HS (Fall 18).

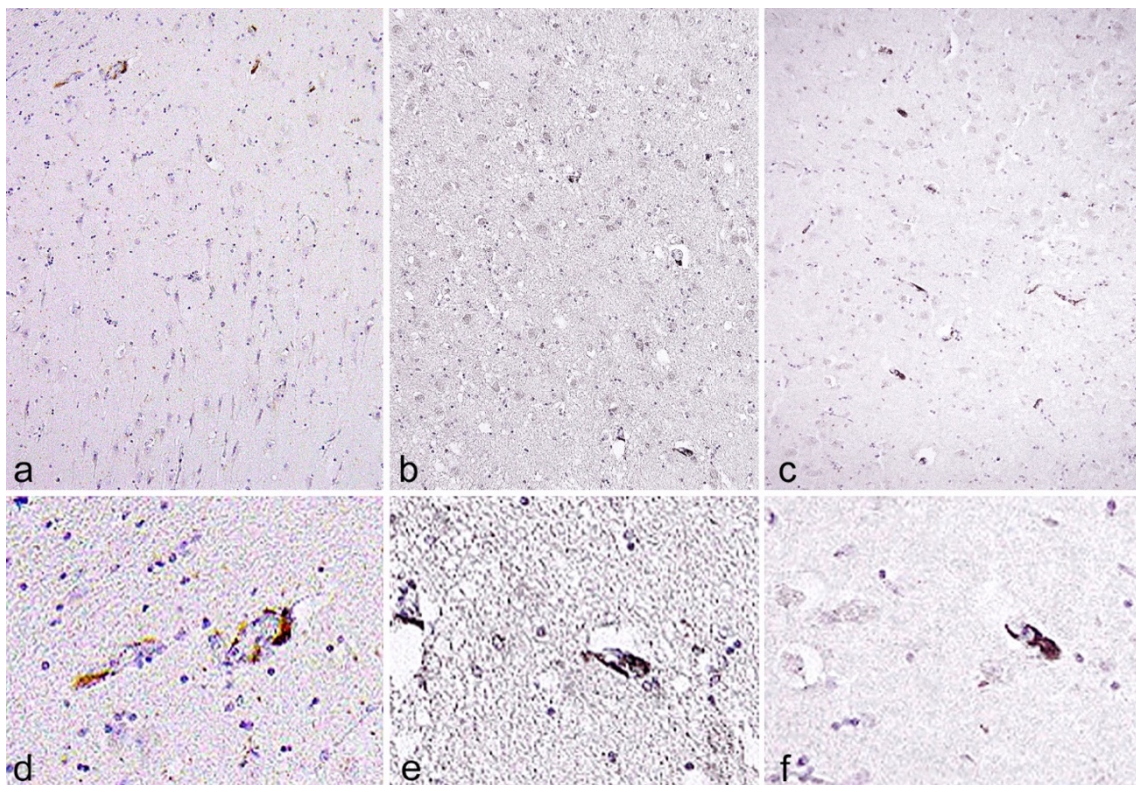


Abbildung 11: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit CD206 (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermediäre AD, c: fortg. AD. Vergrößerung a-c: 200-fach. In Abbildung d-f: 400-fach vergrößerte Darstellung der Morphologie CD206+ Zellen in der Kontrollgruppe (d) intermediären AD (e) bzw. fortgeschrittenen AD (f).

Tabelle 6: Zelldichte (Zellen/mm²) CD206+ Mikroglia innerhalb der drei Gruppen (Kontroll-, intermed. AD- und fortg. AD-Gruppe) in den untersuchten Hirnregionen.

Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung CD206+ Zellen

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
OL	43.0 ± 21.7	33.1 ± 16.7	33.0 ± 20.1	57.4 ± 16.6°
HC	39.3 ± 21.6	30.1 ± 13.1	28.4 ± 21.2	55.4 ± 19.2°
KH	17.9 ± 8.4	16.11 ± 9.5	17.25 ± 8.1	19.9 ± 6.8
HS	45.7 ± 21.4	31.8 ± 19.2*	41.1 ± 17.4	60.5 ± 17.3

Angaben in Zellen/mm² Mittelwert ± Standardabweichung; OL= Okzipitallappen; HC= Hippokampus, HS= Hirnstamm, KH= Kleinhirn; interm. AD= intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD= fortgeschrittene Alzheimer Demenz; *p < 0.05 versus fortg. AD, °p < 0.05 versus Kontrolle und intermed. AD, Die signifikanten Unterschiede (*p < 0.05) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.4.1 Vergleich CD206+ Mikroglia innerhalb der Regionen

Im Okzipitallappen (OL) trat eine minimale Zelldichte intrakortikaler CD206+ Zellen von 8 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe) und eine maximale von 83 Zellen/mm² (aus der fortg. AD) auf. In der Kontrollgruppe des OL war der Mittelwert 33.11 Zellen/mm², die Standardabweichung ergab 16.7 Zellen/mm². Im Verlauf kam es zwischen der Kontrollgruppe (M=33.1; SD±16.7) und der intermed. AD (M=33.0; SD±20.1) zu keiner signifikanten Änderung der Zelldichte. Zwischen der intermed. und der fortg. AD (M=57.45; SD±16.57) verzeichnete sich ein signifikanter Anstieg (p=0.04). Die fortg. AD ist im OL signifikant zellreicher als die Kontrollen (p=0.02).

Die minimale Zelldichte CD206+ Mikroglia im **Hippokampus (HC)** ergab 1 Zelle/mm² (intermed. AD) und die maximale 89 Zellen/mm² (fortg. AD). Die Zelldichte der CD206+ Mikroglia in der Kontrollgruppe ist mit einem Mittelwert von M=30.1 und einer Standardabweichung von SD ± 13.1 Zellen/mm² marginal höher als die der intermed. AD (M=28.4; SD±21.2). Von der intermed. AD zur fortg. AD stieg die Zelldichte höchst signifikant (p< 0.001) auf einen Mittelwert von M=55.4 und einer Standardabweichung von SD±19.2 Zellen/mm² an. Ebenso ist die fortg. AD signifikant zellreicher als die Kontrollgruppe (p=0.002).

Die minimale Zelldichte der CD206+ Mikroglia im **Hirnstamm (HS)** betrug 4 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe), die maximale 87 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Im HS nahm die Zelldichte von der Kontrollgruppe (M=31.78; SD±19,19) zur intermed. AD (M=41.13; SD±17,37) und von dort zur fortg. AD (M=60.45; SD±17,32) jeweils nicht signifikant zu. Die HS Kontrollgruppe ist signifikant zellärmer als die fortg. AD (p=0.005).

Abbildung 12 enthält die grafische Darstellung der Verteilung CD206+ Mikroglia in den untersuchten Regionen im Krankheitsverlauf.

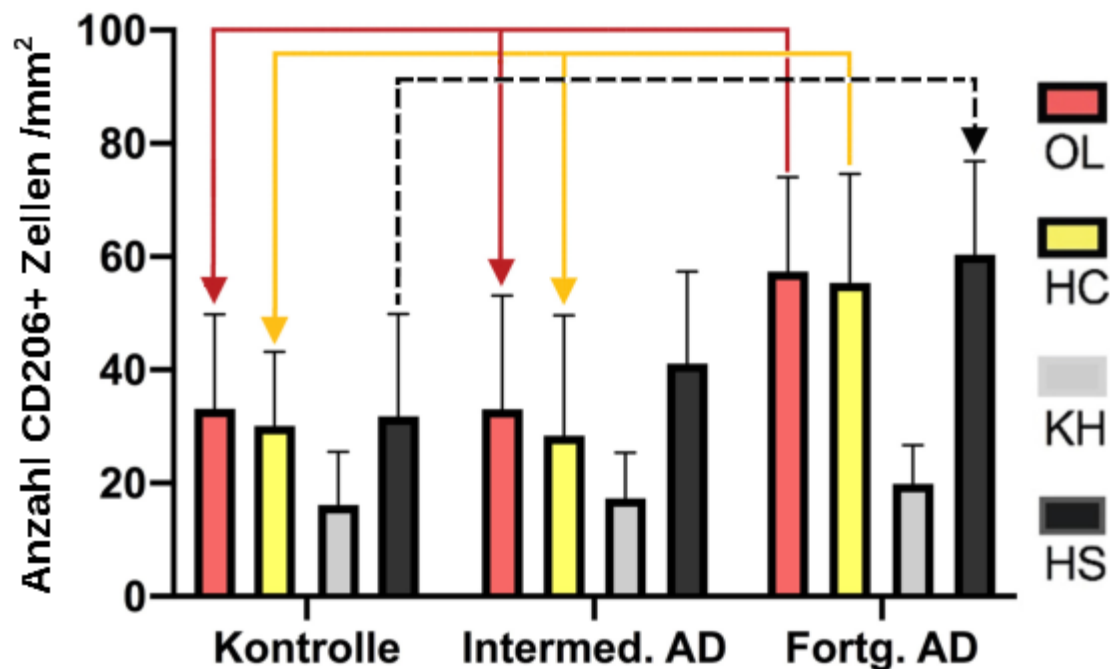


Abbildung 12: Balkendiagramm der CD206+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD). Die Balken zeigen die Mittelwerte der positiven Zellen/mm², Whiskers die Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede (p < 0.05), dargestellt durch die Pfeile, basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.4.2 Vergleich CD206+ Mikroglia zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums

Werden die Zelldichten der **untersuchten Regionen innerhalb eines Stadiums** miteinander verglichen, so konnte innerhalb der Kontrollgruppe und des intermed. AD kein statistischer Zusammenhang zwischen den Regionen festgestellt werden. Im fortg. AD war einzig das KH gegenüber allen Regionen höchst signifikant am zellärmsten ($p < 0.001$).

Wird die **Gesamtzahl** aller CD206+ Zellen der untersuchten Regionen, **ungeachtet der AD Progression**, über alle Stadien hinweg miteinander verglichen, so ließen sich, bis auf das KH, das mit $M=17.92$; $SD\pm 8.45$ Zellen/ mm^2 gegenüber allen anderen Regionen die höchst signifikant zellärmste Region ist ($p < 0.001$), keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Regionen erkennen. Die zellreichste Region war der HS mit $M=45.71$; $SD\pm 21.4$ Zellen/ mm^2 , gefolgt vom OL ($M=43.00$; $SD\pm 21.7$) und HC ($M=39.3$; $SD\pm 21.6$).

3.2.5 Verhältnisanalyse HLA-DR, CD163 und CD206

Zur Untersuchung der Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischen (HLA-DR+) und antiinflammatorischen (CD163 und CD206+) Mikrogliazellen, wurde innerhalb der Regionen für jedes Stadium und über alle Stadien hinweg die Differenz aus den M1/M2-Populationen gebildet und diese statistisch mit einer ANOVA verglichen.

Tabelle 7: Tabellarische Zusammenfassung der Differenzen aus HLA-DR+ und (CD163+ & CD206+) Mikroglia.

	Alle Gruppen	Kontrolle	Interm. AD	Fortg. AD
OL	91.1 ± 142.1	-0.78 ± 96.8	123.6 ± 95.3	142.7 ± 171.2
HC	299.4 ± 254.2	104.5 ± 143.4*	393.8 ± 206.1	404.5 ± 272.7
HS	334.5 ± 230.9	208.6 ± 119.1	417.3 ± 190.9	384.9 ± 289

Angaben in Zellen/ mm^2 Mittelwert ± Standardabweichung; OL= Okzipitallappen; HC= Hippokampus, HS= Hirnstamm, KH= Kleinhirn; interm. AD= intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD= fortgeschrittene Alzheimer Demenz; * $p < 0.05$ versus intermed. AD und fortg. AD, Die signifikanten Unterschiede (* $p < 0.05$) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

In allen Regionen lassen sich mit dem Voranschreiten der AD eine verstärkte proinflammatorische Ausrichtung der Mikroglia Polarität finden. Dies ist erkennbar an den steigenden Werten der Differenzen aus den anti- und proinflammatorischen Zellen.

Im OL und HS waren keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Gruppen erkennbar, das Signifikanzniveau im OL für Kontrollgruppe vs. fortg. AD lag bei $p=0.680$. Im **OL** stieg die Differenz aus proinflammatorischer und antiinflammatorischer gerichteter Mikroglia von der Kontrollgruppe ($M=-0.78$; $SD\pm 96.8$) zur intermed. AD ($M=123.6$; $SD\pm 95.3$) und von dort zur fortg. AD ($M=142.7$; $SD\pm 171.2$) wiederholt an.

Das pro- zu antiinflammatorische Verhältnis der Mikroglia war im **HS** in der Kontrollgruppe ($M=-208.6$; $SD\pm 119.1$) am geringsten und in der intermed. AD mit einem Mittelwert von $M=417.3$ und einer Standardabweichung von $SD\pm 190.9$ am größten, leicht größer als in der fortg. AD ($M=384.9$; $SD\pm 289$).

Im **HC** waren die Differenzen aus pro-zu antiinflammatorischen Mikroglia innerhalb der intermed. AD ($M=393.8$; $SD\pm 206.1$) und der fortg. AD ($M=404.5$; $SD\pm 272.7$) etwa konstant. Für beide Stadien sind die Differenzen höchst signifikant größer als die in der Kontrollgruppe ($p=0.001$; $p<0.001$),

Das pro- zu antiinflammatorische Verhältnis der Mikroglia stieg im **HS** von der Kontrollgruppe ($M=-208.6$; $SD\pm 119.1$) zur intermed. AD ($M=417.3$; $SD\pm 190.9$) und nahm von dort zur fortg. AD ($M=384.9$; $SD\pm 289$) etwas ab.

Die Ergebnisse der Verteilungsverhältnisse sind tabellarisch in **Tabelle 7** und grafisch in **Abbildung 13, a, b, c** zusammengefasst.

a) Okzipitallappen (OL)

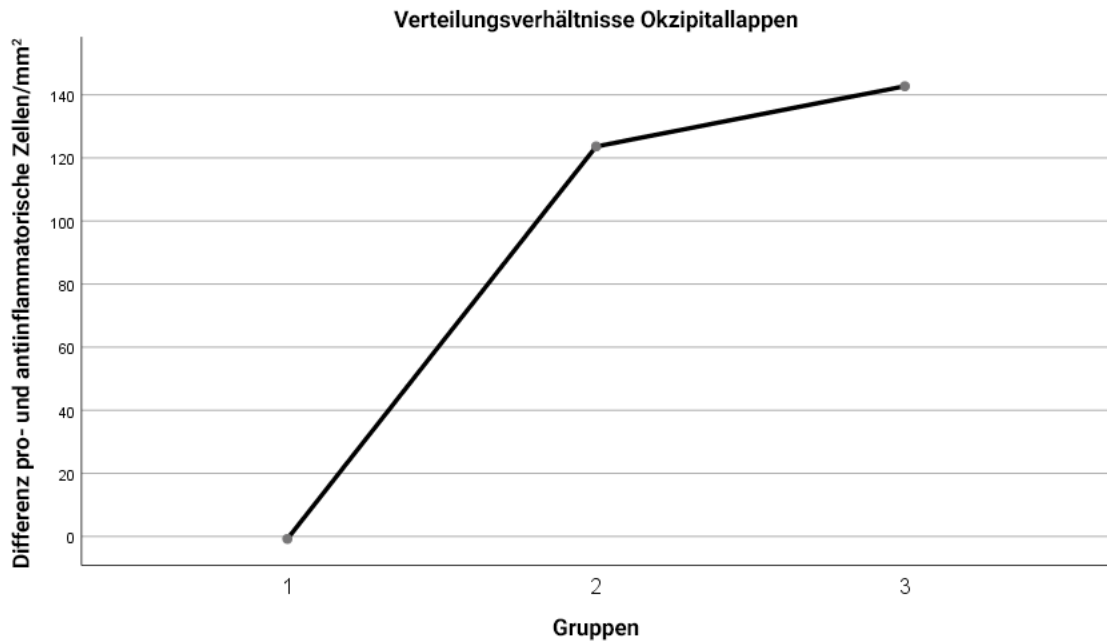


Abbildung 13a: Darstellung der Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischen (HLA-DR+) und anti-inflammatorischen (CD163+ und CD206+) Mikrogliazellen für den Okzipitallappen (OL)

b) Hippokampus (HC)

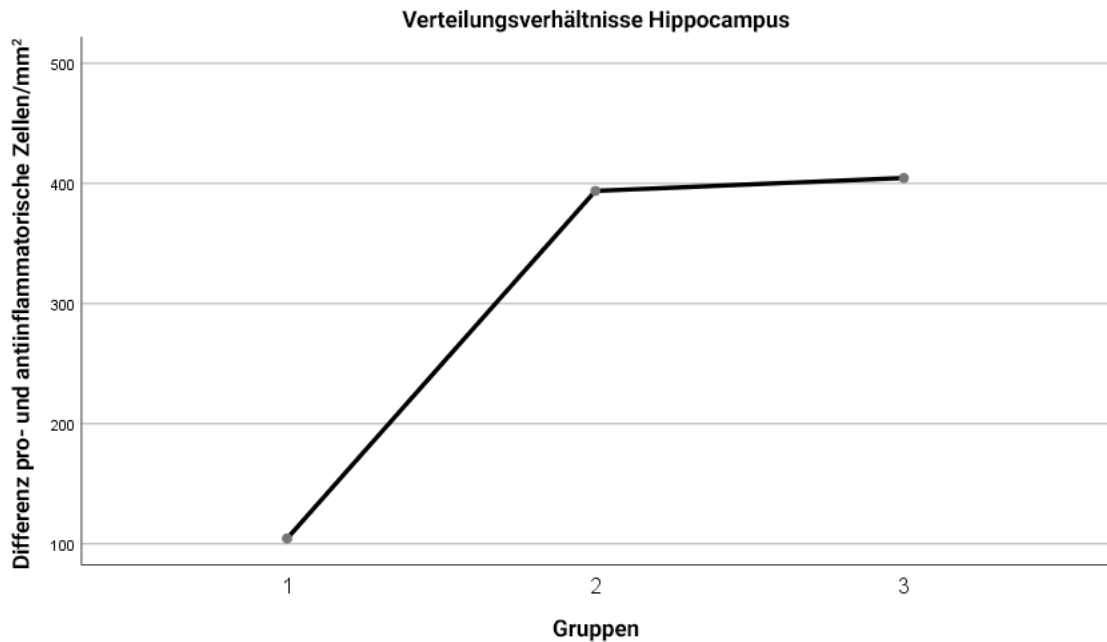


Abbildung 13b: Darstellung der Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischen (HLA-DR+) und anti-inflammatorischen (CD163+ und CD206+) Mikrogliazellen für den Hippokampus (HC),

c) Hirnstamm (HS)

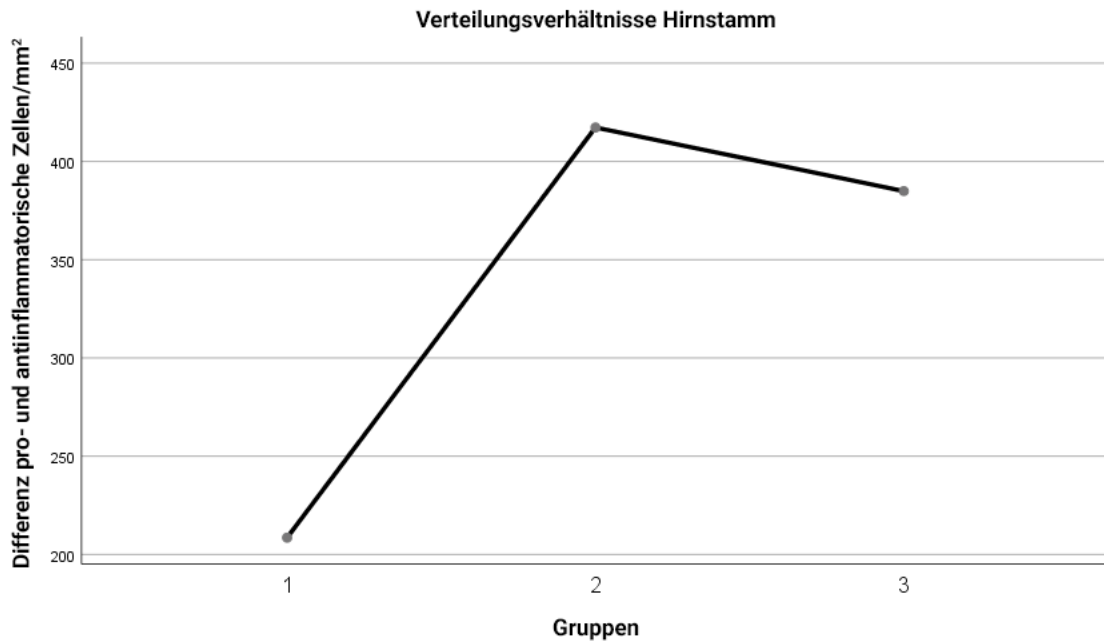


Abbildung 13c: Darstellung der Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischen (HLA-DR+) und anti-inflammatorischen (CD163+ und CD206+) Mikrogliazellen für den Hirnstamm (HS).

3.2.6 CCR2

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der BMDM an der AD-Pathogenese wurden die verschiedenen Regionen dem Marker für CCR2 gefärbt. Folgend sind in **Abbildung 14** exemplarisch Bilder der CCR2 Färbung aus dem Hippokampus dargestellt. Hierbei zeigt sich eine geringe Zunahme der Anzahl von CCR2+ Mikroglia im Krankheitsverlauf. Die Zellen bleiben dabei über alle Stadien hinweg disseminiert intraparenchymatös verteilt und sind nicht zu Zellhaufen zusammengelagert aufzufinden.

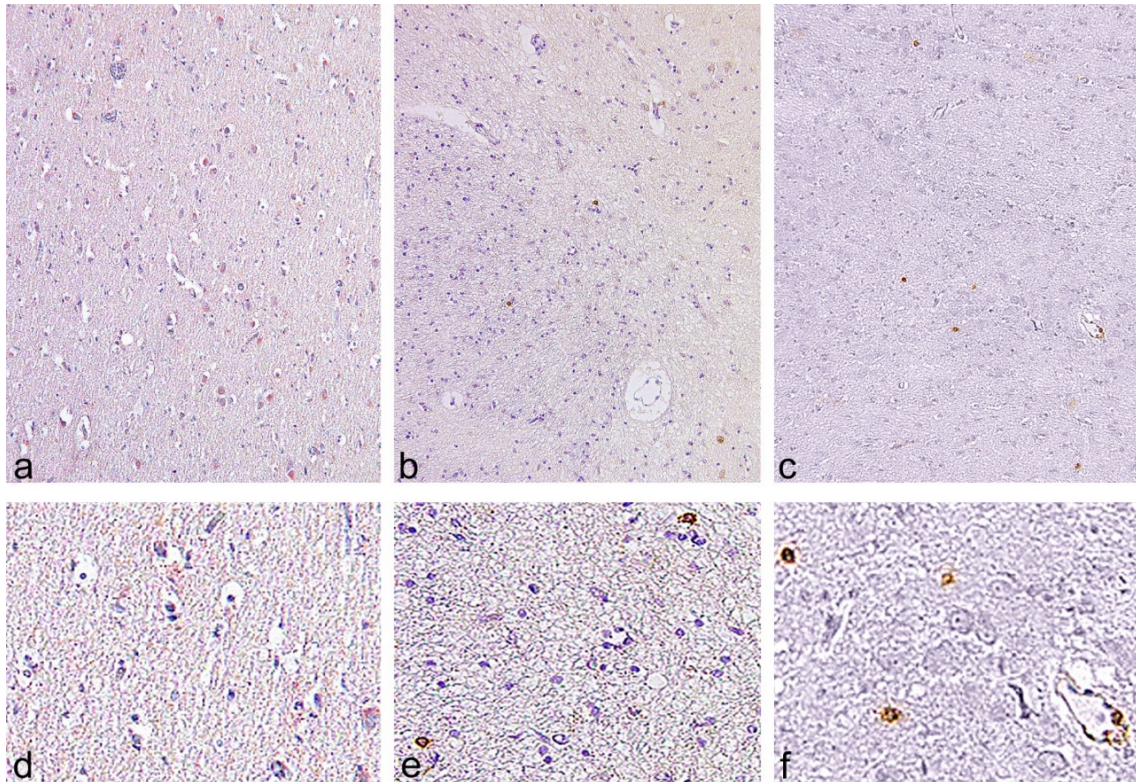


Abbildung 14: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit CCR2 (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung a-c: 200-fach. In Abbildung d-f: 400-fach vergrößerte Darstellung der Morphologie CCR2+ Zellen in der Kontrollgruppe (d) intermediären AD (e) bzw. fortgeschrittenen AD (f).

Die **Tabelle 8:** Zelldichte (Zellen/mm²) CCR2+ Monozyten innerhalb der drei Gruppen (Kontroll-, intermed. AD- und fortg. AD-Gruppe) in den untersuchten Hirnregionen.

Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung CCR2+ Zellen

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
OL	12.2 ± 6.0	8.11 ± 6.01	14.25 ± 9.67	14.0 ± 8.58
HC	15.74 ± 22.8	7.5 ± 5.2	8.9 ± 6.1	18.1 ± 16.9
KH	4.78 ± 3.36	3.1 ± 2.1	5.3 ± 2.5	5.8 ± 3.9
HS	25.3 ± 13.7	26.4 ± 16.3	26.7 ± 16.0	23.3 ± 10.5

Angaben in Zellen/mm² Mittelwert ± Standardabweichung; OL= Okzipitallappen; HC= Hippocampus, HS= Hirnstamm, KH= Kleinhirn; interm. AD= intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD= fortgeschrittene Alzheimer Demenz;

3.2.6.1 Vergleich CCR2+ Monozyten innerhalb der Regionen

Im **Okzipitallappen (OL)** ist die minimale Zelldichte intrakortikaler CCR2+ Zellen 2 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe) und die maximale 37 Zellen/mm² (aus der intermed. AD). In der Kontrollgruppe betrug der Mittelwert $M=8.11$ Zellen/mm² und die Standardabweichung $SD=6.01$ Zellen/mm². Zwischen der Kontrollgruppe ($M=8.11$; $SD\pm 5.67$) und der intermed. AD ($M=14.25$; $SD\pm 9.67$) kam es zu einem Anstieg der Zelldichte. Von der intermed. Gruppe zum fortgeschrittenen Stadium ($M=14.00$; $SD\pm 8.18$) blieb diese annähernd gleich.

Die minimale Zelldichte der CCR2+ Monozyten im **Hippokampus (HC)** lag bei 0 Zellen/mm² (aus der intermed. AD) und die maximale bei 51 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Die Zelldichte der CCR2+ Monozyten in der HC Kontrollgruppe war mit einem Mittelwert von $M=7.5$ und einer Standardabweichung von $SD\pm 5.2$ Zellen/mm² nicht signifikant geringer als die in der intermed. AD ($M=8.9$; $SD\pm 6.1$). Die fortg. AD ist mit einem Mittelwert von $M=27.7$ und einer Standardabweichung von $SD\pm 33.0$ Zellen/mm² zellreicher als die intermed. AD.

Die minimale Zelldichte CCR2+ Monozyten im **Hirnstamm (HS)** lag bei 7 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe), die maximale bei 65 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Es zeigte sich keine signifikante Änderung zwischen der Kontrollgruppe ($M=26.44$; $SD\pm 16.25$) und der intermed. AD ($M=26.75$; $SD\pm 16.00$). Die fortg. AD ($M=23.27$; $SD\pm 10.52$) stellte sich nicht signifikant zellärmer als die intermed. AD und die Kontrollgruppe dar.

Abbildung 15 enthält die grafische Darstellung der Verteilung CCR2+ Monozyten in den untersuchten Regionen im Krankheitsverlauf.

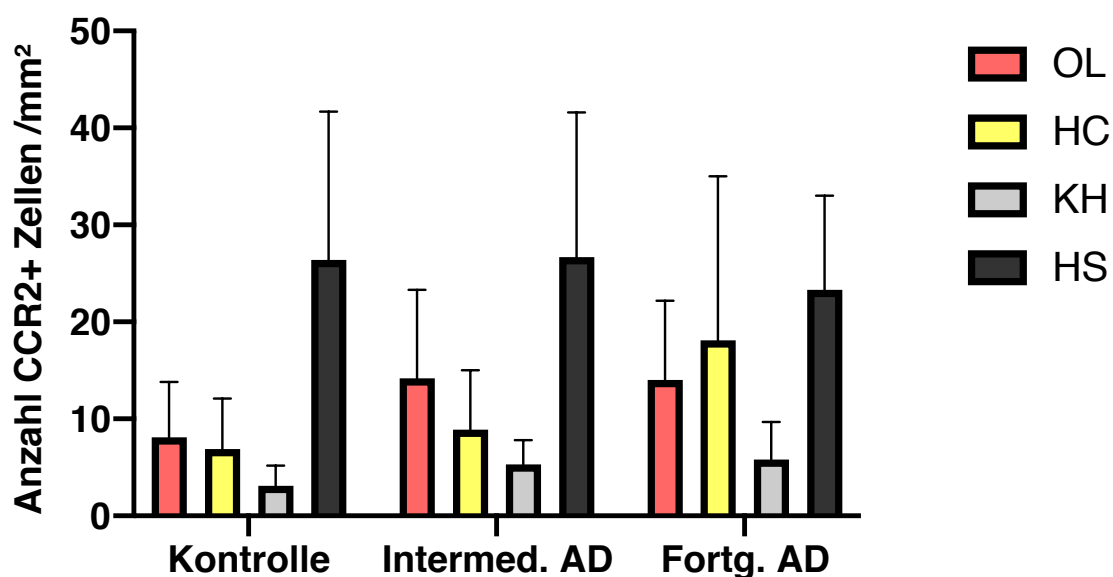


Abbildung 15: Balkendiagramm der CCR2+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD). Die Balken zeigen die Mittelwerte der positiven Zellen/mm², Whiskers die Standardabweichung.

3.2.6.2 Vergleich CCR2+ Monozyten zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums

Werden die Zelldichten der **untersuchten Regionen innerhalb eines Stadiums** miteinander verglichen, so war der HS innerhalb der Kontrollgruppe gegenüber allen Regionen höchst signifikant zellreicher an CCR2+ Monozyten ($p < 0.001$). Der HS war in der intermed. AD ebenfalls höchst signifikant zellreicher als der HC und das KH ($p = 0.001$). In der fortg. AD waren keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Regionen erkennbar ($p = 0.058$ für HC vs. KH).

Wird die **Gesamtzahl** aller CCR2+ Zellen der unterschiedlichen Regionen, **ungeachtet der AD Progression**, über alle Stadien hinweg miteinander verglichen, so findet sich im HS die größte Zelldichte ($M = 25.3$; $SD \pm 13.7$), gefolgt vom HC ($M = 15.7$; $SD \pm 22.8$), OL ($M = 12.2$; $SD \pm 8.4$) und KH ($M = 4.8$; $SD \pm 3.4$). Die Zelldichte der CCR2+ Monozyten ist im HS im Mittel über alle Stadien hinweg signifikant größer als im OL und KH ($p = 0.02$, $p < 0.001$). Die Gesamtzahl aller CCR2+ Monozyten im HC ist ebenfalls signifikant höher als im KH. ($p = 0.03$)

3.2.7 AT-8

Die AT-8-Färbung wurde für die Darstellung des hyperphosphorylierten Tau-Proteins in Neuronen verwendet. Während in den Kontrollgehirnen lediglich vereinzelte Vorstufen (schwach angefärbte Neurone, sog. „pre-tangles“) vorkommen, nimmt die Anzahl an positiven Zellen („tangles“) im Krankheitsverlauf zu. Folgend sind in **Abbildung 16** Aufnahmen der AT8-Färbung aus dem Hippokampus im Krankheitsverlauf exemplarisch gezeigt.

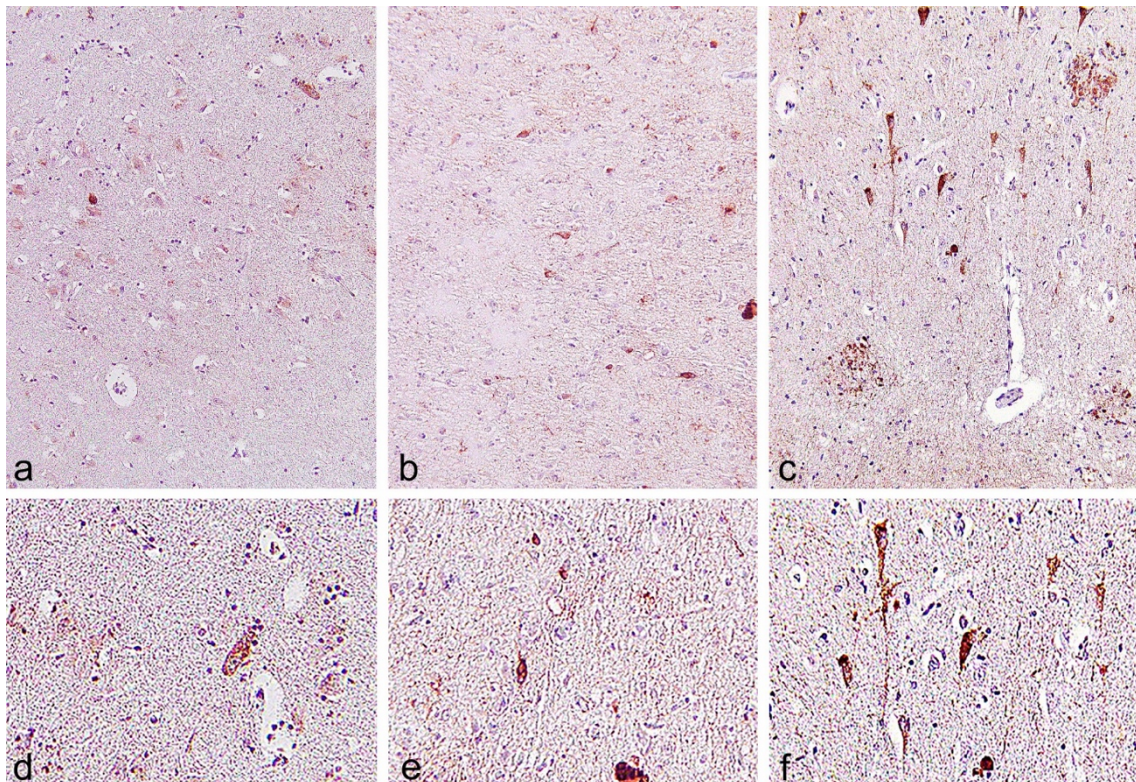


Abbildung 16: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit AT8 (positive Zellen rot angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung a-c: 200-fach. In Abbildung d-f: 400-fach vergrößerte Darstellung der Morphologie AT+ Neurone in der Kontrollgruppe (d) intermediären AD (e) bzw. fortgeschrittenen AD (f).

Die **Tabelle 9**: Zelldichte (Zellen/mm²) AT-8+ Neurone aller untersuchter Regionen.

Tabelle 9: Tabellarische Zusammenfassung AT-8+ Neurone

	Alle Gruppen	Kontrollen	Interm. AD	Fortg. AD
OL	73.6 ± 95.6	6.0 ± 5.9	6.3 ± 6.6	178.0 ± 69.8°
HC	113.8 ± 110.8	10.2 ± 9.3	85.2 ± 49.5	219.4 ± 96.1°
KH	1.57 ± 2.77	2.33 ± 4.27	1.38 ± 1.65	1.00 ± 2.39
HS	50.71 ± 49.65	13.7 ± 12.0	21.8 ± 12.7	102.1 ± 40.0°

Angaben in Zellen/mm² Mittelwert ± Standardabweichung; OL= Okzipitallappen; HC= Hippokampus, HS= Hirnstamm, KH= Kleinhirn; interm. AD= intermediäre Alzheimer Demenz; fortg. AD= fortgeschrittene Alzheimer Demenz; °p < 0.05 versus Kontrolle und intermed. AD, Die signifikanten Unterschiede (p < 0.05) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni.

3.2.7.1 Vergleich AT-8+ Neurone innerhalb der Regionen

Im **Okzipitallappen (OL)** war die minimale Zelldichte intrakortikaler AT8+ Neurone 0 Zellen/mm² (aus der intermed. AD), die maximale 323 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). In der Kontrollgruppe des OL betrug der Mittelwert M=6.0 Zellen/mm² und die Standardabweichung SD±5.9 Zellen/mm². Die Zelldichte nahm von der Kontrollgruppe zur Gruppe der intermed. AD (M=6.3; SD±6.6 Zellen/mm²) leicht zu. Zwischen der intermed. AD und der fortg. AD (M=178.00; SD±69.8) verzeichnete sich ein höchst signifikanter Anstieg der Zelldichte intrakortikaler AT8+ Neurone (p<0.001). Die Kontrollgruppe des OL ist gegenüber der fortg. AD höchst signifikant ärmer an AT8+ Neuronen (p < 0.001).

Die minimale Zelldichte AT8+ Neurone im **Hippokampus (HC)** lag bei 2 Zellen/mm² (aus der Kontrollgruppe) und die maximale bei 407 Zellen/mm² (aus der fortg. AD). Im HC zeigte sich von der Kontrollgruppe (M=10.2; SD±9.3) zur intermed. AD (M=85.2; SD±49.5) eine Zunahme. Zwischen der Gruppe der intermed. AD und der fortg. AD (M=219.4; SD±96.1) kam es zu einer signifikanten Zunahme (p=0.001). Die Kontrollgruppe des HC ist gegenüber der fortg. AD höchst signifikant zellärmer (p < 0.001).

Die minimale Zelldichte der AT8+ Neurone im **Hirnstamm (HS)** zählte 2 Zellen/mm² (aus der intermed. AD), der Maximalwert lag bei 157 Zellen/mm² (aus

der fortg. AD). Im HS stieg die Zelldichte von der Kontrollgruppe (M=13.7; SD±12.0) zur intermediären AD (M=21.7; SD±12.7) und von dort zur fortg. AD (M=102.1; SD± 40.0) höchst signifikant an ($p < 0.001$). Die Kontrollgruppe des HS ist gegenüber der fortg. AD ebenfalls höchst signifikant zellärmer ($p < 0.001$). Im KH ließen sich in keinem der Stadien abnorme Tau+ Neurone finden. Auf Grund unspezifischer Kernfärbungen in einzelnen Fällen sind dennoch falsch positive Zellen mit ausgezählt worden, was sich in der Auswertung bemerkbar macht.

Abbildung 17 enthält die grafische Darstellung der Verteilung AT-8+ Neurone in den untersuchten Regionen im Krankheitsverlauf.

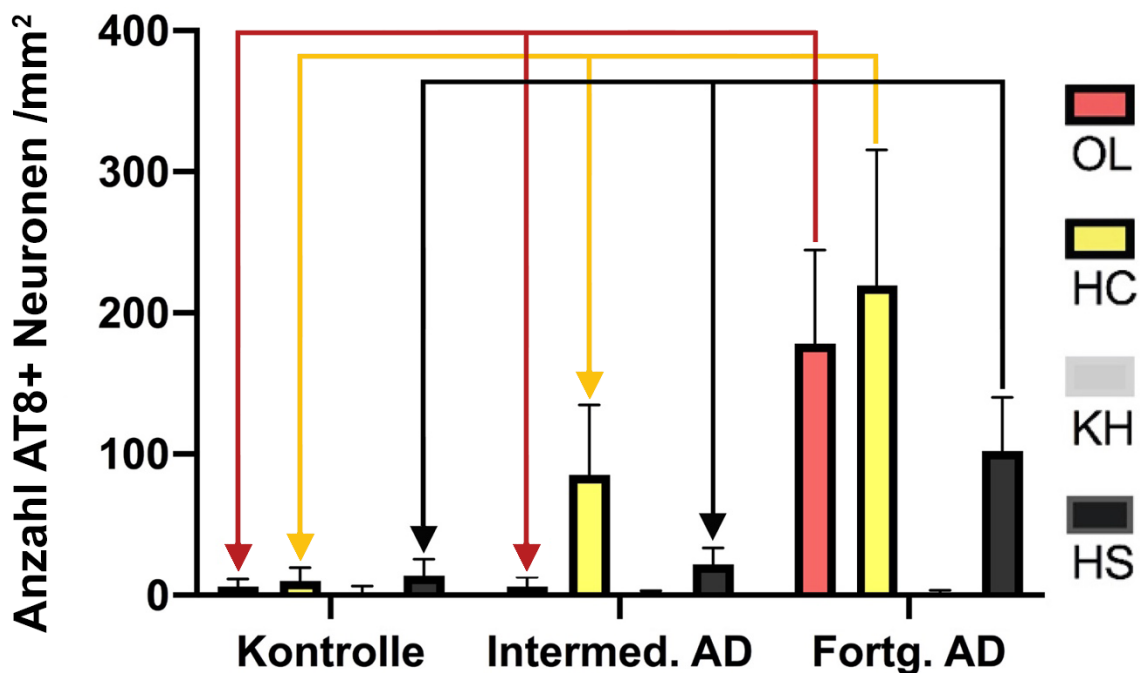


Abbildung 17: Balkendiagramm der AT-8+ Neurone im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD). Die Balken zeigen die Mittelwerte der positiven Zellen/mm², Whiskers die Standardabweichung. Die signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$) basieren auf der statistischen Analyse mittels ANOVA und Post-hoc nach Bonferroni

3.2.7.2 Vergleich AT-8+ Neurone zwischen den Regionen innerhalb eines Stadiums

Werden die Zelldichten der **untersuchten Regionen innerhalb eines Stadiums** miteinander verglichen, so ließen sich in der Kontrollgruppe keine signifikanten Zusammenhänge beobachten.

Wohingegen in der intermed. AD der HC höchst signifikant zellreicher an AT-8+ Neuronen war als alle anderen Regionen ($p < 0.001$).

In der fortg. AD war der HC ebenfalls höchst signifikant zellreicher als das KH, und signifikant zellreicher als der HS und der OL ($p = 0.02$; $p = 0.03$). Der OL hatte zudem eine signifikant höhere Zelldichte als der HS und das KH. ($p = 0.03$; $p = 0.01$)

Wird die **Gesamtzahl** aller AT-8+ Neuronen der untersuchten Regionen, **ungeachtet der AD Progression**, über alle Stadien hinweg miteinander verglichen, so hatte der HC die insgesamt größte Zelldichte ($M = 113.8$; $SD \pm 110.8$) gefolgt vom OL ($M = 73.6$; $SD \pm 95.6$) und HS ($M = 50.71$; $SD \pm 49.65$). Die Zelldichte der AT8+ Neurone ist im Kleinhirn mit einem Mittelwert von $M = 1.57$ und einer Standardabweichung von $SD \pm 2.77$ positiven Zellen/ mm^2 signifikant geringer gegenüber dem OL, HC und HS ($p = 0,005$, $p < 0.001$, $p = 0,002$). Zudem war der HC signifikant zellreicher an AT8+ Neuronen als der HS. ($p = 0.03$).

4. Diskussion

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird der Neuroinflammation, eine von den hirneigenen Immunzellen, den Mikrogliazellen, getragenen Reaktion, eine immer wichtigere Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen, speziell der AD zugeschrieben. Bei der AD scheint die neuroinflammatorische Reaktion auf die neuropathologischen Veränderungen im Gewebe eine zunächst neuroprotektive Rolle zu spielen, wobei im späteren Krankheitsverlauf die überschüssige aberrante Aktivierung der Mikrogliazellen den neuronalen Zelltod offenbar beschleunigt (neurotoxische Wirkung) (Sims et al., 2017; Zhang et al., 2013). In den letzten Jahren wurde durch spezifische Marker versucht, zumindest indirekt Informationen über die Funktion der aktivierten Mikroglia zu gewinnen,

indem man zwei verschiedene Polarisationszustände (M1-proinflammatorisch und M2-phagozytisch) definiert hat.

Zielsetzung der Arbeit war es, an unterschiedlich vulnerablen Hirnregionen das Ausmaß und die Verteilung der verschiedenen, in der Einleitung bereits beschriebenen, Mikrogliazellpopulationen im Verlauf der AD-Progression mittels immunhistochemischen Untersuchungen zu identifizieren und mit einer Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten ohne klinischen und neuropathologischen Nachweis einer neurologischen oder neuropsychiatrischen Erkrankung, zu vergleichen. Zudem sollte mit einem spezifischen Marker geprüft werden, in welchem Ausmaß sich eingewanderte myeloische Immunzellen an dem Krankheitsbild beteiligen. Mit dem Einsatz des Pan-Mikroglia-/Makrophagenmarker CD68 konnte man zunächst einen Überblick über die Gesamtverteilung der Mikroglia in den jeweiligen Regionen und Krankheitsstadien gewinnen.

Eine erste wichtige Beobachtung war, dass es in den untersuchten Regionen mit der Progression der Erkrankung zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl an CD68+ Zellen kam. Ausnahme macht das Kleinhirn, das insgesamt nur sehr gering beteiligt zu sein scheint. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Autoren in immunhistochemisch basierten Studien an humanem postmortem Gewebe (Bachstetter et al., 2015), während andere Autoren lediglich über eine Verdichtung solcher Zellen in der Nähe von Plaques berichten (Dal Bianco et al., 2008). Insbesondere fand sich im Hippokampus, einer sehr früh betroffenen kortikalen Region, eine signifikante Zunahme in intermediären Stadien verglichen mit der Kontrollgruppe, wobei im fortgeschrittenen Stadium keine weitere Zunahme zu sehen war. Andere Autoren berichten über ähnliche Ergebnisse, wobei in einer Studie ein signifikanter Anstieg erst in fortgeschrittenen Braak-Stadien (V-VI) zu verzeichnen war (Sanchez-Mejias et al., 2016).

Der Hirnstamm und genauer die in dieser Arbeit untersuchte Region um den pontinen Locus coeruleus hatte innerhalb der Kontrollgruppe die höchste Anzahl an CD68+ Zellen gezeigt, gleichzeitig auch über alle Stadien hinweg, während das Kleinhirn eine gleichbleibende sehr niedrige Anzahl aufwies. In einer Studie von Mittelbronn et. al, die die Mikrogliaverteilung in gesunden Gehirnen untersucht

hat, konnte ebenfalls die höchste Anzahl an CD68+ Zellen im Hirnstamm (Brücke) und die niedrigste Anzahl im Kleinhirn beobachtet werden (Mittelbronn et al., 2001). Der stetige Anstieg im Hirnstamm im Verlauf der Erkrankung war jedoch für uns etwas überraschend und ließ sich in unserer Kohorte durch die nur sehr gering ausgeprägten oder fehlenden AD-assoziierten Veränderungen nicht erklären. Die Rolle des Hirnstamms in Zusammenhang mit der AD wird kontrovers diskutiert und manche Autoren haben AT-8-Ablagerungen im pontinen Locus coeruleus bereits bei jungen Patienten beschrieben und nehmen somit an, dass die ersten Veränderungen im Hirnstamm stattfinden (Braak & Del Tredici, 2011). In unserem Probenkollektiv konnten wir in frühen Stadien kaum AT-8+ NFT's im Locus coeruleus beobachten, lediglich in Spätstadien kamen sie bei einzelnen Patienten vereinzelt vor.

Als weniger vulnerable Region, die erst in Spätstadien (V-VI) von AD-typischen Veränderungen betroffen ist, zeigte der Okzipitallappen einen langsamen Anstieg und blieb auch im Spätstadium unter dem Wert von Hippokampus und Hirnstamm. Diese Region fand in Studien an postmortem Gewebe von AD Patienten offenbar wenig Beachtung, so dass es hierzu nur wenige Publikationen gibt. Unser Ergebnis ist im Einklang mit dem von Rezaie et al., die im Okzipitallappen von Patienten mit AD ebenfalls eine moderate bis intensive CD68- und HLA-DR-Reaktivität, vor allem um die senilen Plaques, fanden (Rezaie et al., 2005).

Für den Nachweis aktivierter, überwiegend inflammatorisch ausgerichteter M1-Mikroglia kam der Antikörper HLA-DR zum Einsatz. Auch hier war die HLA-DR-Reaktivität des Hirnstamms innerhalb der Kontrollgruppen signifikant hoch gegenüber den anderen Regionen (Mittelbronn et al., 2001). Interessanterweise konnte im HS zwischen Kontrollgruppe und intermediärer AD eine signifikante Zunahme der Zelldichte HLA-DR+ Zellen nachgewiesen werden, die auf eine deutliche Zunahme der Neuroinflammation bereits in frühen Krankheitsstadien zurückschließen lässt, wobei dies nicht mit dem Ausmaß an neurofibrillären Tangles korreliert. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch andere Autoren (Arends et al., 2000; Hoozemans et al., 2005), die ebenfalls in frühen AD Stadien eine Zunahme inflammatorisch aktivierter Mikroglia erkannten. Diese Daten weisen

darauf hin, dass Neuroinflammation in bereits frühen Stadien der AD-Pathogenese involviert ist. Im Vergleich dazu war in fortgeschrittenen AD Stadien im HS keine deutliche Zunahme der HLA-DR Aktivität bemerkbar. Die inflammatorische Mikrogliareaktion scheint somit, mit Ausnahme des Hippokampus, abzuflachen. Im weniger vulnerablen Okzipitallappen fand sich die höchste Anzahl HLA-DR+ Zellen im Spätstadium, wobei bereits im intermediären Stadium ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar war. Dies ist nur teilweise im Einklang mit der Ausbreitungstheorie nach Braak und Braak, nach der der OL erst in späten Stadien von den pathologischen Veränderungen betroffen ist. (Braak & Braak, 1991). Davon ausgehend wäre eine mikrogliale Beteiligung erst in späteren Stadien, mit dem vermehrten Auftreten kranker Neuronen erwartbar. Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass in den Regionen, wie dem OL und HS eine neuroinflammatorische Reaktion bzw. eine mikrogliale Aktivierung noch vor dem Sichtbarwerden der AD-typischen Neuropathologie entsteht, dessen Einfluss auf den Krankheitsverlauf aktuell unklar ist. (neuroprotektiv vs. schädlich)

Der M2-Polarisationszustand der Mikroglia scheint eine eher untergeordnete Rolle in der Pathogenese der AD zu spielen. So konnte insgesamt eine niedrigere Anzahl an CD163+ und CD206+ Zellen nachgewiesen werden sowie ein langsamer, nicht-signifikanter Anstieg im Krankheitsverlauf festgestellt werden. Hierzu gibt es aktuell nur wenige Publikationen. In zwei relevanten Studien konnte ebenfalls ein leichter Anstieg CD163+ Mikrogliazellen im Krankheitsverlauf im Hippokampus und Okzipitallappen beobachtet werden (Dal Bianco et al., 2008; Pey et al., 2014). Im AD Mausmodell konnte allenfalls ein geringer Anstieg von perivaskulären CD206+ Mikrogliazellen im Krankheitsverlauf im Hippokampus in einzelnen Untersuchungen nachgewiesen werden (Mammana et al., 2018; Scholtzova et al., 2014). Auch diese Studien bestätigen die geringere Beteiligung der CD206+ Mikroglia an der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen, die M2-Polarisation ist bekanntlich eher ein Merkmal der tumorassoziierten Makrophagen, die protumorale Eigenschaften besitzen und somit das Tumorwachstum unterstützen (Roesch et al., 2018).

Im Gegensatz zu akuten Ereignissen wie Trauma, Entzündung, Ischämie und Blutung, wobei bekanntlich zahlreiche Monozyten in das geschädigte Hirnparenchym einwandern (Deng et al., 2009; Dimitrijevic et al., 2007), konnte in unserer Studie keine nennenswerte Beteiligung der aus dem Blut eingewanderten CCR2+ Monozyten beobachtet werden. Es fanden sich lediglich singuläre Zellen in allen untersuchten Hirnregionen und Stadien, wobei der Hirnstamm insgesamt die höchste Anzahl positiver Zellen aufwies, gefolgt vom Hippokampus. Untersuchungen am AD Mausmodell konnten zeigen, dass CCR2+ Monozyten offenbar in das Gehirn einwandern und sich am Abbau von Amyloid Plaques beteiligen (Theriault et al., 2015). Andere Studien haben gezeigt, dass CCR2-Antagonisten, die bei chronischen inflammatorischen Erkrankungen eingesetzt werden, das Fortschreiten der AD beschleunigen können (El Khoury et al., 2007). Möglicherweise funktioniert dieser Mechanismus im fortgeschrittenen Alter im humanen Gehirn weniger effizient, so dass die „Anwerbung“ von Monozyten nur noch in sehr reduzierter Anzahl oder gar nicht mehr stattfindet. In einer Studie wurde zudem gezeigt, dass Monozyten von AD Patienten eine deutlich geringer ausgeprägte phagozytische Aktivität aufweisen als Monozyten von Gesunden (Avagyan et al., 2009), so dass in letzter Zeit über Transplantationen von Knochenmarkstammzellen von Gesunden bei Patienten mit AD als therapeutische Möglichkeit nachgedacht wird (Theriault et al., 2015).

Betrachtet man die Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischer M1-Mikroglia (HLA-DR) und antiinflammatorischer M2-Mikroglia (CD163, CD206) zeigte sich im Hippokampus in der intermediären und fortgeschrittenen AD-Gruppe jeweils ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Das heißt, dass die proinflammatorischen Mikrogliazelle im Vergleich zu der antiinflammatorischen Mikroglia eine Prädominanz zeigt, die im Krankheitsverlauf auch leicht zunimmt. Eine ähnliche Tendenz, wenn auch nicht signifikant, konnte im Okzipitallappen festgestellt werden, während es im Hirnstamm nach einer deutlichen Zunahme in intermediären Stadien in Spätstadien zu einem Abfall kommt.

Aktuell mehren sich die Hinweise, dass nach einer anfänglichen protektiven Funktion die Mikroglia eine „Seneszenz“ erleidet und es somit im Verlauf zu einem Defizit der immunologischen Antwort kommen kann, das die Progression der Erkrankung sogar beschleunigt (Sarlus & Heneka, 2017; Ulland et al., 2017).

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie bringt neue Erkenntnisse bezüglich der Rolle und Verteilung der Mikroglia und der eingewanderten Monozyten im Verlauf der Alzheimer Erkrankung in postmortem Gehirnen. Im Gegensatz zu Studien an Tiermodellen konnten wir in unserer Kohorte eine nur sehr geringe Beteiligung myeloischer Monozyten an der AD Pathologie beobachten, so dass man annehmen kann, dass bei Menschen die Immunantwort des Gehirns hauptsächlich von den hirn-eigenen Mikrogliazellen getragen wird. Dies wurde an humanem postmortem Hirngewebe bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die vulnerablen, früh von Tangles und Plaques betroffenen Hirnregionen auch eine frühe Mikrogliareaktion aufweisen und insbesondere von proinflammatorischen Zellen besiedelt werden und dass die Reaktion in manchen Regionen im Verlauf zunimmt, während in anderen eine Abflachung oder sogar Abnahme beobachtet wird.

6. Verzeichnisse:

6.1 Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013, Jan 11). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*, 339(6116), 156-161. <https://doi.org/10.1126/science.1227901>
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G., & Wyss-Coray, T. (2000, May-Jun). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21(3), 383-421. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00124-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00124-x)
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999, Nov 18). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 117(2), 145-152. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(99\)00113-3](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00113-3)
- Alzheimer, A. (1907, 1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralbl. Nervenhe. Psych.*, 18, 177-179. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008335947/en/>
- Andersen, P. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press. Table of contents only <http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip069/2006007088.html>
Publisher description <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0725/2006007088-d.html>
- Arends, Y. M., Duyckaerts, C., Rozemuller, J. M., Eikelenboom, P., & Hauw, J. J. (2000, Jan-Feb). Microglia, amyloid and dementia in alzheimer disease. A correlative study. *Neurobiol Aging*, 21(1), 39-47. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00094-4](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00094-4)
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., Wolozin, B., Butovsky, O., Kugler, S., & Ikezu, T. (2015, Nov). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1584-1593. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>
- Avagyan, H., Goldenson, B., Tse, E., Masoumi, A., Porter, V., Wiedau-Pazos, M., Sayre, J., Ong, R., Mahanian, M., Koo, P., Bae, S., Micic, M., Liu, P. T., Rosenthal, M. J., & Fiala, M. (2009, May 29). Immune blood biomarkers of Alzheimer disease patients. *J Neuroimmunol*, 210(1-2), 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.02.015>
- Bachstetter, A. D., Van Eldik, L. J., Schmitt, F. A., Neltner, J. H., Ighodaro, E. T., Webster, S. J., Patel, E., Abner, E. L., Kryscio, R. J., & Nelson, P. T. (2015,

- May 23). Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathol Commun*, 3, 32. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0209-z>
- Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010, Oct 21). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, 68(2), 270-281. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.013>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006, Jul 29). Alzheimer's disease. *Lancet*, 368(9533), 387-403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007, Jan). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 57-69. <https://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Bourne, J. A. (1983). *Handbuch der Immunperoxidase-Färbemethoden*. Dako Corporation.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239-259. <https://doi.org/10.1007/bf00308809>
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2011, Feb). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol*, 121(2), 171-181. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0789-4>
- Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., & Del Tredici, K. (2011, Nov). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70(11), 960-969. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379>
- Chawla, A., Nguyen, K. D., & Goh, Y. P. (2011, Oct 10). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 738-749. <https://doi.org/10.1038/nri3071>
- Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., Introna, M., & Allavena, P. (2003, Nov 1). Cross-linking of the mannose receptor on monocyte-derived dendritic cells activates an anti-inflammatory immunosuppressive program. *Journal of Immunology*, 171(9), 4552-4560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4552>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., & Tolnay, M. (2009, Jul). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*, 11(7), 909-913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>

- Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J. L., & Rovere, C. (2010, Jul 27). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 224(1-2), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.010>
- Dal Bianco, A., Bradl, M., Frischer, J., Kutzelnigg, A., Jellinger, K., & Lassmann, H. (2008, Feb). Multiple sclerosis and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 63(2), 174-183. <https://doi.org/10.1002/ana.21240>
- Deng, Y. Y., Lu, J., Ling, E. A., & Kaur, C. (2009, Apr 15). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) produced via NF-kappaB signaling pathway mediates migration of amoeboid microglia in the periventricular white matter in hypoxic neonatal rats. *Glia*, 57(6), 604-621. <https://doi.org/10.1002/glia.20790>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009, Jun). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29(6), 313-326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Diaz-Nido, J., Wandosell, F., & Avila, J. (2002, Jul). Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides*, 23(7), 1323-1332. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(02\)00068-2](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(02)00068-2)
- Dimitrijevic, O. B., Stamatovic, S. M., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2007, Apr). Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*, 38(4), 1345-1353. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000259709.16654.8f>
- Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M. C. (2009, Jul). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 5-36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>
- El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S. E., Means, T. K., Terada, K., Geula, C., & Luster, A. D. (2007, Apr). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med*, 13(4), 432-438. <https://doi.org/10.1038/nm1555>
- Fabriek, B. O., van Bruggen, R., Deng, D. M., Ligtenberg, A. J., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R. P., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2009, Jan 22). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*, 113(4), 887-892. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167064>
- Fabriek, B. O., Van Haastert, E. S., Galea, I., Polfliet, M. M., Dopp, E. D., Van Den Heuvel, M. M., Van Den Berg, T. K., De Groot, C. J., Van Der Valk, P., & Dijkstra, C. D. (2005, Sep). CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia*, 51(4), 297-305. <https://doi.org/10.1002/glia.20208>

- Fiala, M., Liu, Q. N., Sayre, J., Pop, V., Brahmandam, V., Graves, M. C., & Vinters, H. V. (2002, May). Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(5), 360-371. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2002.00994.x>
- Fillenbaum, G. G., van Belle, G., Morris, J. C., Mohs, R. C., Mirra, S. S., Davis, P. C., Tariot, P. N., Silverman, J. M., Clark, C. M., Welsh-Bohmer, K. A., & Heyman, A. (2008, Mar). Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): the first twenty years. *Alzheimers Dement*, 4(2), 96-109. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.08.005>
- Galea, I., Palin, K., Newman, T. A., Van Rooijen, N., Perry, V. H., & Boche, D. (2005, Feb). Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia*, 49(3), 375-384. <https://doi.org/10.1002/glia.20124>
- Giess, R., & Schlote, W. (1995, Oct 27). Localisation and association of pathomorphological changes at the brainstem in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, 84(3), 209-226. <https://doi.org/0047637495016570> [pii]
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010, Nov 5). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
- Gosztyla, M. L., Brothers, H. M., & Robinson, S. R. (2018). Alzheimer's Amyloid-beta is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence. *J Alzheimers Dis*, 62(4), 1495-1506. <https://doi.org/10.3233/JAD-171133>
- Gouras, G. K., Olsson, T. T., & Hansson, O. (2015, Jan). beta-Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 12(1), 3-11. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0313-y>
- Gouras, G. K., Tampellini, D., Takahashi, R. H., & Capetillo-Zarate, E. (2010, May). Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 119(5), 523-541. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0679-9>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T., & Kummer, M. P. (2015, Apr).

- Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14(4), 388-405.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heyderman, E. (1979, Oct). Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. *J Clin Pathol*, 32(10), 971-978.
<https://doi.org/10.1136/jcp.32.10.971>
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K., & El Khoury, J. (2013, Dec). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*, 16(12), 1896-1905.
<https://doi.org/10.1038/nn.3554>
- Holness, C. L., & Simmons, D. L. (1993, Mar 15). Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 81(6), 1607-1613. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680921>
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Veerhuis, R., Arendt, T., Scheper, W., Eikelenboom, P., & Rozemuller, A. J. (2005, Nov 21). Maximal COX-2 and ppRb expression in neurons occurs during early Braak stages prior to the maximal activation of astrocytes and microglia in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 2, 27. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-27>
- Hsu, S.-M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 29(4), 577-580.
- Hyman, B. T., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Carrillo, M. C., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Thies, B., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V., & Montine, T. J. (2012, Jan). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 8(1), 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.10.007>
- Iqbal, K., Alonso Adel, C., Chen, S., Chohan, M. O., El-Akkad, E., Gong, C. X., Khatoon, S., Li, B., Liu, F., Rahman, A., Tanimukai, H., & Grundke-Iqbal, I. (2005, Jan 3). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1739(2-3), 198-210.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.09.008>
- Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2008, Jan-Feb). Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med*, 12(1), 38-55. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00225.x>
- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., & Selkoe, D. (1989, Oct). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer

- disease. *Journal of Neuroimmunology*, 24(3), 173-182.
[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90115-x](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90115-x)
- Kerrigan, A. M., & Brown, G. D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*, 214(7), 562-575. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.11.003>
- Kiyota, T., Yamamoto, M., Xiong, H., Lambert, M. P., Klein, W. L., Gendelman, H. E., Ransohoff, R. M., & Ikezu, T. (2009, Jul 10). CCL2 accelerates microglia-mediated Abeta oligomer formation and progression of neurocognitive dysfunction. *Plos One*, 4(7), e6197.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006197>
- Kretschmar, H. A., & Neumann, M. (2000, Sep). [Neuropathological diagnosis of neurodegenerative and dementia diseases]. *Pathologe*, 21(5), 364-374.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092009> (Die neuropathologische Diagnostik neurodegenerativer und demenzieller Krankheiten.)
- Lamb, R., Rohrer, J. D., Lees, A. J., & Morris, H. R. (2016, Sep). Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration: Pathophysiology and Treatment Options. *Curr Treat Options Neurol*, 18(9), 42.
<https://doi.org/10.1007/s11940-016-0422-5>
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thorton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., Vardarajan, B. N., Kamatani, Y., Lin, C. F., Gerrish, A., Schmidt, H., Kunkle, B., Dunstan, M. L., Ruiz, A., Bihoreau, M. T., Choi, S. H., Reitz, C., Pasquier, F., Cruchaga, C., Craig, D., Amin, N., Berr, C., Lopez, O. L., De Jager, P. L., Deramecourt, V., Johnston, J. A., Evans, D., Lovestone, S., Letenneur, L., Moron, F. J., Rubinsztein, D. C., Eiriksdottir, G., Sleegers, K., Goate, A. M., Fievet, N., Huentelman, M. W., Gill, M., Brown, K., Kamboh, M. I., Keller, L., Barberger-Gateau, P., McGuinness, B., Larson, E. B., Green, R., Myers, A. J., Dufouil, C., Todd, S., Wallon, D., Love, S., Rogaeva, E., Gallacher, J., St George-Hyslop, P., Clarimon, J., Lleó, A., Bayer, A., Tsuang, D. W., Yu, L., Tsolaki, M., Bossu, P., Spalletta, G., Proitsi, P., Collinge, J., Sorbi, S., Sanchez-Garcia, F., Fox, N. C., Hardy, J., Deniz Naranjo, M. C., Bosco, P., Clarke, R., Brayne, C., Galimberti, D., Mancuso, M., Matthews, F., European Alzheimer's Disease, I., Genetic, Environmental Risk in Alzheimer's, D., Alzheimer's Disease Genetic, C., Cohorts for, H., Aging Research in Genomic, E., Moebus, S., Mecocci, P., Del Zompo, M., Maier, W., Hampel, H., Pilotto, A., Bullido, M., Panza, F., Caffarra, P., Nacmias, B., Gilbert, J. R., Mayhaus, M., Lannefelt, L., Hakonarson, H., Pichler, S., Carrasquillo, M. M., Ingelsson, M., Beekly, D., Alvarez, V., Zou, F., Valladares, O., Younkin, S. G., Coto, E., Hamilton-Nelson, K. L., Gu, W., Razquin, C., Pastor, P., Mateo, I., Owen, M. J., Faber, K. M., Jonsson, P. V., Combarros, O., O'Donovan, M. C., Cantwell, L. B., Soininen, H., Blacker, D., Mead, S., Mosley, T. H., Jr., Bennett, D. A., Harris, T. B., Fratiglioni, L., Holmes, C., de Bruijn, R. F., Passmore, P., Montine, T. J., Bettens, K., Rotter, J. I., Brice, A., Morgan, K., Foroud, T. M.,

- Kukull, W. A., Hannequin, D., Powell, J. F., Nalls, M. A., Ritchie, K., Lunetta, K. L., Kauwe, J. S., Boerwinkle, E., Riemenschneider, M., Boada, M., Hiltunen, M., Martin, E. R., Schmidt, R., Rujescu, D., Wang, L. S., Dartigues, J. F., Mayeux, R., Tzourio, C., Hofman, A., Nothen, M. M., Graff, C., Psaty, B. M., Jones, L., Haines, J. L., Holmans, P. A., Lathrop, M., Pericak-Vance, M. A., Launer, L. J., Farrer, L. A., van Duijn, C. M., Van Broeckhoven, C., Moskvina, V., Seshadri, S., Williams, J., Schellenberg, G. D., & Amouyel, P. (2013, Dec). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*, *45*(12), 1452-1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Larner, A. J. (1997, Jul-Aug). The cerebellum in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, *8*(4), 203-209. <https://doi.org/10.1159/000106632>
- Lau, S. K., Chu, P. G., & Weiss, L. M. (2004, Nov). CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*, *122*(5), 794-801. <https://doi.org/10.1309/QHD6-YFN8-1KQX-UUH6>
- Lee, Y. B., Nagai, A., & Kim, S. U. (2002, Jul 1). Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res*, *69*(1), 94-103. <https://doi.org/10.1002/jnr.10253>
- London, A., Cohen, M., & Schwartz, M. (2013). Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 34. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00034>
- Mack, M., Cihak, J., Simonis, C., Luckow, B., Proudfoot, A. E., Plachy, J., Bruhl, H., Frink, M., Anders, H. J., Vielhauer, V., Pfirstinger, J., Stangassinger, M., & Schlondorff, D. (2001, Apr 1). Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *Journal of Immunology*, *166*(7), 4697-4704. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.7.4697>
- Mammana, S., Fagone, P., Cavalli, E., Basile, M. S., Petralia, M. C., Nicoletti, F., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2018, Mar 13). The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*, *19*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030831>
- McGeer, P. L., Itagaki, S., & McGeer, E. G. (1988). Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol*, *76*(6), 550-557. <https://doi.org/10.1007/BF00689592>
- Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H. J., & Meyermann, R. (2001, Mar). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol*, *101*(3), 249-255. <https://doi.org/10.1007/s004010000284>

- Moehle, M. S., & West, A. B. (2015, Aug 27). M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience*, 302, 59-73.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.018>
- Montine, T. J., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V., Hyman, B. T., National Institute on, A., & Alzheimer's, A. (2012, Jan). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathologica*, 123(1), 1-11.
<https://doi.org/10.1007/s00401-011-0910-3>
- Mortimer, J. A. (2012, Jul). The Nun Study: risk factors for pathology and clinical-pathologic correlations. *Current Alzheimer Research*, 9(6), 621-627.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22471869>
- Naish, S. J., Boenisch, T., & Mally, M. (1989). *Handbuch II immunchemischer Färbemethoden*. Dako Corporation.
<https://books.google.de/books?id=V70PcgAACAAJ>
- Perry, V. H., Nicoll, J. A., & Holmes, C. (2010, Apr). Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 6(4), 193-201.
<https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.17>
- Pey, P., Pearce, R. K., Kalaitzakis, M. E., Griffin, W. S., & Gentleman, S. M. (2014, Feb 14). Phenotypic profile of alternative activation marker CD163 is different in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 21.
<https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-21>
- Rezaie, P., Pontikis, C. C., Hudson, L., Cairns, N. J., & Lantos, P. L. (2005, Aug). Expression of cellular prion protein in the frontal and occipital lobe in Alzheimer's disease, diffuse Lewy body disease, and in normal brain: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem*, 53(8), 929-940.
<https://doi.org/10.1369/jhc.4A6551.2005>
- Roesch, S., Rapp, C., Dettling, S., & Herold-Mende, C. (2018, Feb 1). When Immune Cells Turn Bad-Tumor-Associated Microglia/Macrophages in Glioma. *Int J Mol Sci*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020436>
- Saederup, N., Cardona, A. E., Croft, K., Mizutani, M., Cotleur, A. C., Tsou, C. L., Ransohoff, R. M., & Charo, I. F. (2010, Oct 27). Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *Plos One*, 5(10), e13693.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013693>
- Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Sanchez-Mico, M., Sanchez-Varo, R., Nunez-Diaz, C., Trujillo-Estrada, L., Davila, J. C., Vizuetete, M., Gutierrez, A., &

- Vitorica, J. (2016, Dec). Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol*, 132(6), 897-916. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1630-5>
- Sarlus, H., & Heneka, M. T. (2017, Sep 1). Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, 127(9), 3240-3249. <https://doi.org/10.1172/JCI90606>
- Schaer, C. A., Vallelian, F., Imhof, A., Schoedon, G., & Schaer, D. J. (2007, Jul). CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J Leukoc Biol*, 82(1), 106-110. <https://doi.org/10.1189/jlb.0706453>
- Scholtzova, H., Chianchiano, P., Pan, J., Sun, Y., Goni, F., Mehta, P. D., & Wisniewski, T. (2014, Sep 2). Amyloid beta and Tau Alzheimer's disease related pathology is reduced by Toll-like receptor 9 stimulation. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 101. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0101-2>
- Shi, S. R., Key, M. E., & Kalra, K. L. (1991, Jun). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 39(6), 741-748. <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>
- Sims, R., van der Lee, S. J., Naj, A. C., Bellenguez, C., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Kunkle, B. W., Boland, A., Raybould, R., Bis, J. C., Martin, E. R., Grenier-Boley, B., Heilmann-Heimbach, S., Chouraki, V., Kuzma, A. B., Sleegers, K., Vronskaya, M., Ruiz, A., Graham, R. R., Olausson, R., Hoffmann, P., Grove, M. L., Vardarajan, B. N., Hiltunen, M., Nothen, M. M., White, C. C., Hamilton-Nelson, K. L., Epelbaum, J., Maier, W., Choi, S. H., Beecham, G. W., Dulary, C., Herms, S., Smith, A. V., Funk, C. C., Derbois, C., Forstner, A. J., Ahmad, S., Li, H., Bacq, D., Harold, D., Satizabal, C. L., Valladares, O., Squassina, A., Thomas, R., Brody, J. A., Qu, L., Sanchez-Juan, P., Morgan, T., Wolters, F. J., Zhao, Y., Garcia, F. S., Denning, N., Fornage, M., Malamon, J., Naranjo, M. C. D., Majounie, E., Mosley, T. H., Dombroski, B., Wallon, D., Lupton, M. K., Dupuis, J., Whitehead, P., Fratiglioni, L., Medway, C., Jian, X., Mukherjee, S., Keller, L., Brown, K., Lin, H., Cantwell, L. B., Panza, F., McGuinness, B., Moreno-Grau, S., Burgess, J. D., Solfrizzi, V., Proitsi, P., Adams, H. H., Allen, M., Seripa, D., Pastor, P., Cupples, L. A., Price, N. D., Hannequin, D., Frank-Garcia, A., Levy, D., Chakrabarty, P., Caffarra, P., Giegling, I., Beiser, A. S., Giedraitis, V., Hampel, H., Garcia, M. E., Wang, X., Lannfelt, L., Mecocci, P., Eiriksdottir, G., Crane, P. K., Pasquier, F., Boccardi, V., Henandez, I., Barber, R. C., Scherer, M., Tarraga, L., Adams, P. M., Leber, M., Chen, Y., Albert, M. S., Riedel-Heller, S., Emilsson, V., Beekly, D., Braae, A., Schmidt, R., Blacker, D., Masullo, C., Schmidt, H., Doody, R. S., Spalletta, G., Longstreth, W. T., Jr., Fairchild, T. J., Bossu, P., Lopez, O. L., Frosch, M. P., Sacchinelli, E., Ghetti, B., Yang, Q., Huebinger, R. M., Jessen, F., Li, S., Kamboh, M. I., Morris, J., Sotolongo-Grau, O., Katz, M. J., Corcoran, C., Dunstan, M., Braddel, A., Thomas, C., Meggy, A., Marshall, R., Gerrish, A., Chapman, J., Aguilar, M., Taylor, S., Hill, M., Fairen, M. D., Hodges, A., Vellas, B., Soininen, H.,

Kloszewska, I., Daniilidou, M., Uphill, J., Patel, Y., Hughes, J. T., Lord, J., Turton, J., Hartmann, A. M., Cecchetti, R., Fenoglio, C., Serpente, M., Arcaro, M., Caltagirone, C., Orfei, M. D., Ciaramella, A., Pichler, S., Mayhaus, M., Gu, W., Lleo, A., Fortea, J., Blesa, R., Barber, I. S., Brookes, K., Cupidi, C., Maletta, R. G., Carrell, D., Sorbi, S., Moebus, S., Urbano, M., Pilotto, A., Kornhuber, J., Bosco, P., Todd, S., Craig, D., Johnston, J., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Fox, N. C., Hardy, J., Consortium, A., Albin, R. L., Apostolova, L. G., Arnold, S. E., Asthana, S., Atwood, C. S., Baldwin, C. T., Barnes, L. L., Barral, S., Beach, T. G., Becker, J. T., Bigio, E. H., Bird, T. D., Boeve, B. F., Bowen, J. D., Boxer, A., Burke, J. R., Burns, J. M., Buxbaum, J. D., Cairns, N. J., Cao, C., Carlson, C. S., Carlsson, C. M., Carney, R. M., Carrasquillo, M. M., Carroll, S. L., Diaz, C. C., Chui, H. C., Clark, D. G., Cribbs, D. H., Crocco, E. A., DeCarli, C., Dick, M., Duara, R., Evans, D. A., Faber, K. M., Fallon, K. B., Fardo, D. W., Farlow, M. R., Ferris, S., Foroud, T. M., Galasko, D. R., Gearing, M., Geschwind, D. H., Gilbert, J. R., Graff-Radford, N. R., Green, R. C., Growdon, J. H., Hamilton, R. L., Harrell, L. E., Honig, L. S., Huentelman, M. J., Hulette, C. M., Hyman, B. T., Jarvik, G. P., Abner, E., Jin, L. W., Jun, G., Karydas, A., Kaye, J. A., Kim, R., Kowall, N. W., Kramer, J. H., LaFerla, F. M., Lah, J. J., Leverenz, J. B., Levey, A. I., Li, G., Lieberman, A. P., Lunetta, K. L., Lyketsos, C. G., Marson, D. C., Martiniuk, F., Mash, D. C., Masliah, E., McCormick, W. C., McCurry, S. M., McDavid, A. N., McKee, A. C., Mesulam, M., Miller, B. L., Miller, C. A., Miller, J. W., Morris, J. C., Murrell, J. R., Myers, A. J., O'Bryant, S., Olichney, J. M., Pankratz, V. S., Parisi, J. E., Paulson, H. L., Perry, W., Peskind, E., Pierce, A., Poon, W. W., Potter, H., Quinn, J. F., Raj, A., Raskind, M., Reisberg, B., Reitz, C., Ringman, J. M., Roberson, E. D., Rogaeva, E., Rosen, H. J., Rosenberg, R. N., Sager, M. A., Saykin, A. J., Schneider, J. A., Schneider, L. S., Seeley, W. W., Smith, A. G., Sonnen, J. A., Spina, S., Stern, R. A., Swerdlow, R. H., Tanzi, R. E., Thornton-Wells, T. A., Trojanowski, J. Q., Troncoso, J. C., Van Deerlin, V. M., Van Eldik, L. J., Vinters, H. V., Vonsattel, J. P., Weintraub, S., Welsh-Bohmer, K. A., Wilhelmsen, K. C., Williamson, J., Wingo, T. S., Woltjer, R. L., Wright, C. B., Yu, C. E., Yu, L., Garzia, F., Golamaully, F., Septier, G., Engelborghs, S., Vandenberghe, R., De Deyn, P. P., Fernandez, C. M., Benito, Y. A., Thonberg, H., Forsell, C., Lilius, L., Kinhult-Stahlbom, A., Kilander, L., Brundin, R., Concari, L., Helisalmi, S., Koivisto, A. M., Haapasalo, A., Dermecourt, V., Fievet, N., Hanon, O., Dufouil, C., Brice, A., Ritchie, K., Dubois, B., Himali, J. J., Keene, C. D., Tschanz, J., Fitzpatrick, A. L., Kukull, W. A., Norton, M., Aspelund, T., Larson, E. B., Munger, R., Rotter, J. I., Lipton, R. B., Bullido, M. J., Hofman, A., Montine, T. J., Coto, E., Boerwinkle, E., Petersen, R. C., Alvarez, V., Rivadeneira, F., Reiman, E. M., Gallo, M., O'Donnell, C. J., Reisch, J. S., Bruni, A. C., Royall, D. R., Dichgans, M., Sano, M., Galimberti, D., St George-Hyslop, P., Scarpini, E., Tsuang, D. W., Mancuso, M., Bonuccelli, U., Winslow, A. R., Daniele, A., Wu, C. K., Gerad/Perades, C. A. E., Peters, O., Nacmias, B., Riemenschneider, M., Heun, R., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., Bras, J., Guerreiro, R., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Collinge, J., Mann, D., Tsolaki, M., Clarimon, J., Sussams, R., Lovestone, S., O'Donovan, M. C., Owen, M. J., Behrens, T. W., Mead, S., Goate, A. M., Uitterlinden, A. G., Holmes, C., Cruchaga, C., Ingelsson, M., Bennett, D. A., Powell, J., Golde, T. E., Graff, C.,

- De Jager, P. L., Morgan, K., Ertekin-Taner, N., Combarros, O., Psaty, B. M., Passmore, P., Younkin, S. G., Berr, C., Gudnason, V., Rujescu, D., Dickson, D. W., Dartigues, J. F., DeStefano, A. L., Ortega-Cubero, S., Hakonarson, H., Campion, D., Boada, M., Kauwe, J. K., Farrer, L. A., Van Broeckhoven, C., Ikram, M. A., Jones, L., Haines, J. L., Tzourio, C., Launer, L. J., Escott-Price, V., Mayeux, R., Deleuze, J. F., Amin, N., Holmans, P. A., Pericak-Vance, M. A., Amouyel, P., van Duijn, C. M., Ramirez, A., Wang, L. S., Lambert, J. C., Seshadri, S., Williams, J., & Schellenberg, G. D. (2017, Sep). Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *TREM2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet*, *49*(9), 1373-1384. <https://doi.org/10.1038/ng.3916>
- Takahashi, R. H., Almeida, C. G., Kearney, P. F., Yu, F., Lin, M. T., Milner, T. A., & Gouras, G. K. (2004, Apr 7). Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J Neurosci*, *24*(14), 3592-3599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5167-03.2004>
- Taniguchi, T., Kawamata, T., Mukai, H., Hasegawa, H., Isagawa, T., Yasuda, M., Hashimoto, T., Terashima, A., Nakai, M., Mori, H., Ono, Y., & Tanaka, C. (2001, Mar 30). Phosphorylation of tau is regulated by PKN. *J Biol Chem*, *276*(13), 10025-10031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007427200>
- Theriault, P., ElAli, A., & Rivest, S. (2015). The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, *7*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0125-2>
- Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A., Loginicheva, E., Gilfillan, S., Cella, M., Virgin, H. W., Unanue, E. R., Wang, Y., Artyomov, M. N., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2017, Aug 10). *TREM2* Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell*, *170*(4), 649-663 e613. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.023>
- Walker, D. G., & Lue, L. F. (2015, Aug 19). Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther*, *7*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0139-9>
- Williamson, J., Goldman, J., & Marder, K. S. (2009, Mar). Genetic aspects of Alzheimer disease. *Neurologist*, *15*(2), 80-86. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e318187e76b>
- Yamamoto, M., Horiba, M., Buescher, J. L., Huang, D., Gendelman, H. E., Ransohoff, R. M., & Ikezu, T. (2005, May). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1/*CCL2* in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *Am J Pathol*, *166*(5), 1475-1485. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62364-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62364-4)

Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L. G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelezhnikov, A. A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., Fluder, E., Clurman, B., Melquist, S., Narayanan, M., Suver, C., Shah, H., Mahajan, M., Gillis, T., Mysore, J., MacDonald, M. E., Lamb, J. R., Bennett, D. A., Molony, C., Stone, D. J., Gudnason, V., Myers, A. J., Schadt, E. E., Neumann, H., Zhu, J., & Emilsson, V. (2013, Apr 25). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*, 153(3), 707-720.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.030>

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer Demenz (engl. Alzheimer´s Disease)
A β	Amyloid beta
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
ApoE	Apolipoprotein E4
APP	engl. Amyloid Precursor Protein
AT8	Tau-Antikörper
BMDM	engl. Bone marro derived microglia
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CD	engl. Cluster of Differentiation
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer´s Disease
CBD	kortiko-basale Degeneration
CCR2	engl. C-C chemokine receptor type 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
EB	engl. Elution Buffer
EZR	Extrazellularraum
fortg. AD	fortgeschrittene Alzheimer Demenz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HC	Hippokampus
HS	Hirnstamm
IL	Interleukin
intermed. AD	intermediäre Alzheimer Demenz
KH	Kleinhirn
LC	Locus coeruleus

LOAD	engl. Late-onset Alzheimer´s Disease
MHC-II	Major Histocompatibility Complex class II
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFT	neurofibrilläre Tangles
NIA	National Institute on Aging
OL	Okzipitallappen
p	Signifikanzwert
PSB	progressive supranukleäre Blickparese
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VIP	Vakuum impression processor

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

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der neuropathologischen Veränderungen bei AD, a: neurofibrilläre Tangles, b: β -Amyloid-Plaques, Vergrößerung 200x	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der neuritischen Alzheimer-Pathologie nach Braak und Braak.	5
Abbildung 3: Darstellung der unterschiedlichen Herkunft von Mikroglia und Makrophagen des ZNS, Quelle: Science, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Aguzzi	9
Abbildung 4: Übersichtsdarstellung der untersuchten Hirnregionen.	15
Abbildung 5: Aufnahmen aus dem Hippokampus (HC) für die Färbung mit CD68 (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung: 200-fach.	27
Abbildung 6: Balkendiagramm der CD68+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus (HC), Kleinhirn (KH) und Hirnstamm (HS)	29
Abbildung 7: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit HLA-DR (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung: 200-fach.	31
Abbildung 8: Balkendiagramm der HLA-DR+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus (HC), Kleinhirn (KH) und Hirnstamm (HS) von Kontrollgruppe, intermed. AD und fortg. AD.	33
Abbildung 9: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit CD163 (positive Zellen braun angefärbt); a: Kontrolle, b: intermed. AD, c: fortg. AD. Vergrößerung: 200-fach.	35
Abbildung 10: Balkendiagramm der CD163+ Mikroglia im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermed. AD und fortg. AD.	37
Abbildung 11: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit CD206; a und d: HC Kontrolle, b und e: intermed. AD, c und f: fortg. AD.	38

Abbildung 12: Balkendiagramm der CD206+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD).	40
Abbildung 13a: Darstellung der Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischen (HLA-DR+) und anti-inflammatorischen (CD163+ und CD206+) Mikrogliazellen für den Okzipitallappen (OL)	43
Abbildung 13b: Darstellung der Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischen (HLA-DR+) und anti-inflammatorischen (CD163+ und CD206+) Mikrogliazellen für den Hippokampus (HC),	43
Abbildung 13c: Darstellung der Verteilungsverhältnisse von proinflammatorischen (HLA-DR+) und anti-inflammatorischen (CD163+ und CD206+) Mikrogliazellen für den Hirnstamm (HS).	44
Abbildung 14: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit CCR2; a und d: HC Kontrolle, b und e: intermed. AD, c und f: fortg. AD.	45
Abbildung 15: Balkendiagramm der CCR2+ Zellen im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD).	47
Abbildung 16: Aufnahmen aus dem HC für die Färbung mit AT-8; a und d: Kontrolle, b und e: intermed. AD, c und f: fortg. AD.	48
Abbildung 17: Balkendiagramm der AT-8+ Neurone im Okzipitallappen (OL), Hippokampus, (HC), Hirnstamm (HS) und Kleinhirn (KH) von Kontrollgruppe, intermediärer AD-Gruppe (intermed. AD) und fortgeschrittener AD-Gruppe (fortg. AD).	50

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über n=28 Patienten eingeteilt in 3 Gruppen nach Braak.....	16
Tabelle 2: Demographische Daten der untersuchten Fälle	25
Tabelle 3: Tabellarische Zusammenfassung CD68+ Zellen.....	27
Tabelle 4: Tabellarische Zusammenfassung HLA-DR+ Zellen	32
Tabelle 5: Tabellarische Zusammenfassung CD163+ Zellen.....	35
Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung CD206+ Zellen.....	39
Tabelle 7: Tabellarische Zusammenfassung der Differenzen aus HLA-DR+ und (CD163+ & CD206+) Mikroglia.	41
Tabelle 8: Tabellarische Zusammenfassung CCR2+ Zellen	45
Tabelle 9: Tabellarische Zusammenfassung AT-8+ Neurone	49

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu, für die Überlassung des Themas und die stetige Hilfe und Unterstützung während der gesamten Durchführung und Fertigstellung der Arbeit. Sie stand mir wissenschaftlich mit ihrer fachlichen Kompetenz und menschlich mit ihrer herzlichen Art uneingeschränkt zur Seite.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald, Leiter des Pathologischen Institutes möchte ich mich herzlich bedanken, denn seine initiale Bewilligung und Bereitstellung der notwendigen Materialien und Räumlichkeiten ermöglichten es mir erst diese Arbeit aufzunehmen.

Herrn Prof. Dr. med. Helmut Heinsen möchte ich für die vielen konstruktiven Ideen und Literaturvorschläge meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Priv.-Doz Dr. Luitpold Distel für die Zurverfügungstellung und Anleitung in die automatisierte Auswertung der Schnitte mit dem von seiner Arbeitsgruppe entwickelten Bildanalyzesystem Biomas.

Mein Dank geht auch an Herrn Erwin Schmitt für die hochwertige Bildbearbeitung dieser Doktorarbeit und der daraus entstehenden Publikation und zudem an Herrn Dr. med. Bernhard Puppe für die professionelle Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Auch möchte ich allen technischen Assistentinnen der Neuropathologie Frau Petra Herud, Frau Hannelore Schraut und Frau Michaela Hartmann danken für die Unterstützung und tolle Zusammenarbeit während der Experimentdurchführung.

