

# **Das immunhistologische Profil seniler Plaques in Gehirnen bei M. Alzheimer und nicht-dementen alten Menschen**

INAUGURALDISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Martin Benedikt Thomas Jünemann  
aus  
Neuwied

Gießen 2010

Aus dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Institut für Neuropathologie  
Leiter: Herr Prof. Dr. med. T. Acker

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. K. Kuchelmeister
  2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. T. Acker
- Tag der Disputation: 15.07.2010

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Alzheimer Erkrankung.....	5
1.1.1	Epidemiologie .....	5
1.1.2	Genetik und Pathogenese .....	6
1.1.3	Klinisches Erscheinungsbild.....	12
1.1.4	Diagnostik.....	13
1.1.5	Therapie.....	15
1.2	Charakteristika des physiologisch alternden Gehirns.....	17
1.3	Fragestellung .....	19
2	Material und Methode.....	20
2.1	Patientenkollektiv .....	20
2.2	Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeprobe n .....	21
2.3	Immunhistologie .....	21
2.3.1	Verwendete Antikörper .....	21
2.3.2	Durchführung der immunhistologischen Untersuchungen .....	23
2.4	Befundauswertung .....	25
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Dichte immunreaktiver Plaques .....	27
3.1.1	DAT-Fälle.....	27
3.1.2	Kontrollfälle .....	32
3.2	Vergleichende immunhistologische Untersuchungen von senilen Plaques.....	37
3.2.1	Immunreaktivität ChromograninA-positiver Plaques bei DAT .....	37
3.2.2	Immunreaktivität ChromograninA-positiver Plaques bei Kontrollfällen .....	39
3.2.3	Immunreaktivität AT8-positiver Plaques bei DAT.....	41
3.2.4	Immunreaktivität AT8-positiver Plaques bei Kontrollfällen .....	43
4	Diskussion.....	44
4.1	Material und Methodendiskussion.....	44
4.1.1	Begründung für die Wahl der Antikörper.....	44
4.1.2	Begründung für die Wahl des Auswertungsverfahrens .....	46
4.2	Interpretation der Ergebnisse.....	46
4.3	Zusammenfassung.....	63

4.4	Abstract.....	65
5	Anhang.....	67
5.1	Tabellen .....	67
5.2	Bilder.....	75
6	Abkürzungsverzeichnis .....	93
7	Literaturverzeichnis .....	95
8	Eidesstattliche Erklärung.....	103
9	Danksagung.....	104

# 1 Einleitung

## 1.1 Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer Erkrankung ist heute die häufigste Ursache einer dementiellen Erkrankung. Der Name dieser Erkrankung geht auf Alois Alzheimer zurück, der 1907 erstmals im Gehirn einer Frau mit Demenz auffällige versilberbare Plaquestrukturen und Neurofibrillendegenerationen beschrieben hatte [Alzheimer 1907]. Forschungsarbeiten haben große Teile der molekularen Pathogenese dieser Erkrankung aufgedeckt, und zum Beispiel  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen in den so genannten senilen Plaques und Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein in den Alzheimerschen Neurofibrillen-Veränderungen (neurofibrillären Tangles) nachgewiesen.

Nur ein kleiner Teil der Fälle von Demenz vom Alzheimer Typ (DAT) wird autosomal-dominant vererbt und zeigt einen frühen Beginn [Harvey et al. 2003]. Weitaus häufiger ist die eher später auftretende sporadische Form der Erkrankung, deren Pathogenese als ein Zusammenspiel von Altern, Genetik und Umweltfaktoren zu sehen ist. Aufgrund der hierbei vorliegenden positiven Korrelation von Alter und Häufigkeit der DAT, ist vor dem Hintergrund der gegenwärtigen epidemiologischen Entwicklung mit einer immer älter werdenden Bevölkerung die zunehmende Bedeutung des M. Alzheimer verständlich [Blennow et al. 2006].

Da bis heute die Erkrankung als unheilbar gilt, ist es für die Forschung in naher Zukunft eine große Herausforderung, Strategien zur Prävention und effektive Therapien zu entwickeln.

### 1.1.1 Epidemiologie

Die Demenz vom Alzheimer Typ ist mit 50-60% die häufigste Ursache aller Demenzen. Liegt ihre Prävalenz in der Altersgruppe der 60-64-Jährigen noch unter 1%, so zeigt sich jedoch ein sprunghafter Häufigkeitsanstieg bei älteren Menschen: Die Gesamtprävalenz der Demenz in der Altersgruppe der 85 und älteren beträgt schon zwischen 24% und 33% [Ferri et al. 2005]. Diese Zahlen gelten für die westliche Welt, man kann jedoch trotz der spärlichen Datenlage davon ausgehen, dass auch in Entwicklungsländern 60% der Demenzen vom Alzheimer Typ sind. Die Zahl der an M. Alzheimer Erkrankten belief sich im Jahre 2001 auf 24 Mio. weltweit

und wird sich aller Voraussicht nach alle 20 Jahre verdoppeln, was vor allem auf die sich ständig erhöhende Lebenserwartung zurückzuführen ist [Ferri et al. 2005].

Neben dem Altern an sich, das unter den Risikofaktoren an erster Stelle steht, und bestimmten genetischen Konstellationen, geht man davon aus, dass eine Gruppe von Faktoren, die man unter der ‚Reduzierten Reservekapazität des Gehirns‘ zusammenfasst, wesentlich zur Entstehung der DAT beiträgt: Hierunter werden die Volumenabnahme des Gehirns, niedriges Bildungsniveau und berufliche Qualifikation, niedrige geistige Fähigkeiten in jungen Jahren und reduzierte geistige und körperliche Aktivität in späteren Lebensjahren subsumiert [Mayeux 2003, Mortimer et al. 2003]. Darüber hinaus wird in epidemiologischen Studien ein Schädel-Hirn-Trauma als Risikofaktor beschrieben [Jellinger 2004]. Unsicherheit besteht allerdings hier noch, ob dies über eine direkte Wirkung des Traumas auf die Plaquentstehung oder über den Umweg der eben geschilderten verminderten zerebralen Reservekapazität geschieht. Andere Risikofaktoren sind im Zusammenhang mit zerebralen Gefäßkrankheiten zu sehen, wie z.B. die Hypercholesterinämie, Hypertonie, Artherosklerose, koronare Herzkrankheit, Rauchen, Adipositas und Diabetes mellitus [Mayeux 2003]. Auch hier muss die genaue Ursachen- und Wirkbeziehung noch aufgedeckt werden.

### **1.1.2 Genetik und Pathogenese**

Wie bereits betont, muss im Hinblick auf Genetik und Pathogenese zwischen der familiären und der sporadischen Form dieser Erkrankung unterschieden werden:

Die familiäre Form der Erkrankung unterliegt einem autosomal-dominanten Erbgang und tritt in der Regel vor dem 65. Lebensjahr auf (early onset). Als erstes wurden Mutationen auf dem Chromosom 21 gefunden, die das so genannte amyloid precursor protein (APP) Gen betreffen [Goat et al. 1991]. Diese Mutationen erklären allerdings nur einen Teil der familiären Alzheimer-Fälle. Der größte Anteil geht auf Mutationen im Presenilin-Gen 1 (PSEN1) und 2 (PSEN2) zurück [Levy-Lahad et al. 1995, Sherrington et al. 1995]. Die familiäre Form der DAT liegt nur in etwa 10% der Fälle vor.

Seit den frühen 1990ern liegt ein Schwerpunkt der Forschung, die Genetik der sporadischen Form der Alzheimerschen Erkrankung betreffend, auf der Funktion des Apolipoprotein E (APOE)  $\epsilon$ 4 Allels. Man weiß, dass Apolipoprotein E als ein Cholesteroltransporter im Gehirn fungiert. Als solcher ist APOE4 weniger effizient als die anderen Varianten des APOE, vor allem in der Wiederverwertung von

Membranlipiden und den neuronalen Reparaturmechanismen [Poirier 1994]. Darüber hinaus spielt APOE4 eine wichtige Rolle bei der  $\beta$ -Amyloid-Ablagerung, indem es die A $\beta$ -Fibrillisation und Plaquebildung fördert [Holtzman et al. 2000]. Metaanalysen zeigen, dass heterozygote Träger des APOE  $\epsilon$ 4 Allels ein dreifach erhöhtes, homozygote ein bis zu 15fach erhöhtes Risiko besitzen, später an einer DAT zu erkranken [Farrer et al. 1997]. Der genaue krankheitserzeugende Wirkmechanismus ist aber noch nicht vollständig aufgedeckt. Des Weiteren ist darauf hinzuweisen, dass das APOE-Allel in seiner Wirkung auch immer vor dem Hintergrund einer komplexen Interaktion mit gewissen Umwelt- und Umgebungsfaktoren zu sehen ist. APOE gilt als Allel mit dem größten Risiko, daneben existieren weitere mögliche Allele, die die Entstehung der Erkrankung begünstigen. Diese spielen jedoch nach heutigem Erkenntnisstand eine eher untergeordnete Rolle.

Makroskopisch zeigt sich bei der Demenz vom Alzheimer-Typ eine umschriebene cerebrale Atrophie mit verschmälerten Gyri und erweiterten Sulci, einer Ventrikelerweiterung im Sinne eines Hydrocephalus e vacuo und einer Verschmälerung des cerebralen Rindenbandes. In einem Großteil der Fälle ist jeder Teil des Großhirns davon betroffen, oft jedoch mit Betonung des Temporallappens; lediglich der Okzipitalpol ist in einigen Fällen von diesen Veränderungen ausgespart [Yaari et Corey-Bloom 2007].

Mikroskopisch imponieren als charakteristische Läsionen vor allem senile Plaques und Alzheimersche Neurofibrillenveränderungen (neurofibrilläre Tangles). Letztere treten meist in medio-temporalen und isokortikalen Regionen des Gehirns auf, verbunden mit einer deutlichen neuronalen Degeneration und dem Verlust von Synapsen. Weitere Alzheimer-assoziierte histopathologische Veränderungen sind die  $\beta$ -Amyloidangiopathie cerebraler Arterien und Arteriolen, granulovakuoläre Degenerationen vor allem hippokampaler Neuronen und das Vorliegen so genannter Neuropilfäden [Braak et al. 1999, Ellison et al. 2004, Yaari et Corey-Bloom 2007].

Der Begriff „seniler Plaque“ beschreibt zunächst einmal eine extrazelluläre  $\beta$ -Amyloid-Proteinablagerung, die besonders gut durch immunhistologische Färbungen mittels Antikörper gegen das  $\beta$ -Amyloid oder durch die Versilberungstechnik nach Campbell-Switzer sichtbar zu machen ist und die man morphologisch in verschiedene Plaqueformen weiter unterteilen kann: Die diffusen Plaques, die nur zum Teil Amyloid aufweisen, keinen zentralen Kern (core) besitzen und eher unscharf begrenzt sind [Yaari et Corey-Bloom 2007]; einige Autoren unterschieden hiervon noch die primitiven Plaques, als unregelmäßige Strukturen, die sich von den

diffusen beispielsweise durch die etwas schärfere Begrenzung sowie die häufig geringere Größe unterscheiden [Ellison et al. 2004]. Klassische Plaques sind extrazelluläre sphärische Strukturen, die aus einem zentral gelegenen Kern aus Amyloid bestehen, der von degenerierten oder dystrophen Neuriten umrandet wird [Yaari et Corey-Bloom 2007]. ‚Burnt-out‘ oder ‚dense-core‘ Plaques bestehen nahezu nur aus einem kondensierten Amyloidkern. Wir halten uns im Hinblick auf die Plaquemorphologie jedoch an die Einteilung nach Yaari mit diffusen, klassischen und burnt-out Plaques.

Man vermutet, dass den verschiedenen Plaquearten ein Stadienverlauf zugrunde liegt: In der zeitlichen Abfolge wäre dann ein Progress von diffus nach klassisch und dann zum ‚burned-out Plaque‘ als Endstufe anzunehmen. Diese Theorie kann bis heute jedoch noch nicht direkt bewiesen werden [Ellison et al. 2004]. Die in der Literatur häufig gebräuchliche Bezeichnung „neuritischer Plaque“ betont das Vorhandensein dystropher Neuriten als strukturgebende Komponente eines Plaques [Ellison et al. 2004].

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass solche dystrophen Neuriten das Peptid ChromograninA enthalten und dass ungefähr ein Drittel der  $\beta$ -Amyloid-positiven senilen Plaques auch zusätzlich in der Immunhistologie ChromograninA-positiv zu sein scheint [Duyckaerts et al. 2009, Lechner et al. 2004, Munoz 1991, Wang et Munoz 1995].

ChromograninA ist ein Protein-Prohormon und besteht aus 439 Aminosäuren. Das kodierende Gen ist auf dem Chromosom 14 lokalisiert. ChromograninA gehört zusammen mit ChromograninB, Sekretogranin II und einigen anderen zu den Graninen. Granine sind wasserlösliche saure Proteine in Sekretorischen Vesikeln. Sie kommen in sekretorischen Granula, nicht nur im Gehirn, sondern in den meisten Zellen neuroendokriner Organe vor.

Aufgrund der Häufigkeit der Chromogranine in sekretorischen Vesikeln sowie ihrer Fähigkeit, sowohl mit der vesikulären Membran, als auch mit deren Matrix in Interaktion zu treten, spielen sowohl ChromograninA als auch Chromogranin B eine essentielle Rolle bei der Sortierung und Zusammenlagerung potentieller vesikulärer Matrixproteine zu den unreifen, sekretorischen Vesikeln des regulierten sekretorischen Weges [Yoo et al. 2002].

Darüber hinaus bestätigen immunhistochemische Färbungen das Vorkommen von intrazellulär akkumulierten, filamentösen, ubiquitinierten Einschlüssen bei neurodegenerativen Erkrankungen. Bei der Demenz vom Alzheimer Typ ist eine

positive Reaktion von Antikörpern gegen Ubiquitin sowohl in der Peripherie seniler Plaques, als auch in den neurofibrillären Tangles zu erwarten. Ubiquitin ist ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren, das in nahezu allen eukaryoten Zellen vorkommt und spielt eine wichtige Rolle bei der Markierung von zum Abbau im Proteasom bestimmten Proteinen. Ubiquitiniert werden z.B. Polypeptide welche im Endoplasmatischen Retikulum nicht korrekt gefaltet werden konnten [Löffler et Petrides 2003].

Die pathogenetischen Mechanismen, die den histomorphologischen Veränderungen bei der DAT zu Grunde liegen, umfassen in erster Linie A $\beta$ -Aggregation und Ablagerung mit Plaqueentstehung, sowie Tau-Hyperphosphorylierung in Tangle-Formationen, neurovaskuläre Störungen aber auch andere Mechanismen wie Zellzyklusstörungen, entzündliche Prozesse, oxidativen Stress und mitochondriale Dysfunktion [Blennow et al. 2006]. Die zentrale Hypothese für die Entstehung der Demenz vom Alzheimerstyp ist die so genannte Amyloid-Kaskaden-Hypothese: Diese geht von einer Störung des normalerweise vorhandenen Gleichgewichtes zwischen Produktion und Beseitigung des Amyloids aus. Dieses Ungleichgewicht scheint unausweichlich zur Degeneration von Neuronen und zur Demenz zu führen [Hardy et al. 2002]. Untermauert wird diese These durch die oben erwähnte Mutation bei familiärem M. Alzheimer, bei der sowohl Substrat (APP), als auch Schlüsselenzym (Presenilin) betroffen sei können.

Mitte der 1980er Jahre gelang es, den Hauptbestandteil der unlöslichen Alzheimer- Plaques aufzudecken und die Aminosäuresequenz des  $\beta$ -Amyloid zu entschlüsseln [Masters et al. 1985]. Dies war der Startschuss zur Sequenzierung und Klonierung des APP-Gens [Kang et al. 1987].

Die Enzyme, welche A $\beta$  aus seinem Vorläuferpeptid APP herausschneiden, sind mittlerweile ebenfalls bekannt und werden als  $\beta$ -Sekretase und  $\gamma$ -Sekretase bezeichnet. Die  $\gamma$ -Sekretase besteht aus vier Teilen. Der aktive Teil dieses Intermembranproteins wiederum ist das Presenilin (die übrigen Bestandteile Nicastrin, PEN-2 und APH1) [Gandy 2005]. Die größte Aktivität der  $\beta$ -Sekretase übernimmt eine integrale Membran-Aspartyl-Transferase, das so genannte  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1' (BACE1) [Vassar et al. 1999]. Unter normalen Bedingungen übernehmen die Degradierung des  $\beta$ -Amyloid Proteins die Peptidase Nepilysin (auch Insulin spaltend) und das Endothelin-Converting Enzyme [Carson et Turner 2002].

Die  $\beta$ -Amyloidplaques sind nur eines der wesentlichen histologischen Diagnosekriterien der Alzheimer Krankheit in der Neuropathologie. Ein anderes Kriterium sind neurofibrilläre Tangles, die aus abnorm hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen [Grundke-Iqbal et al. 1986, Nukina et al. 1986]. Das Tau-Protein ist ebenfalls ein in der physiologischen Nervenzelle vorkommendes axonales Protein, das mit einer seiner Bindungsdomänen an den Mikrotubuli des Axons bindet und zu den so genannten Mikrotubulus-assoziierten Proteinen (MAPs) gezählt wird. Hier leistet es einen Beitrag zu dem gerichteten axonalen Transport und zur Stabilität des Nervenfortsatzes. Die Phosphorylierung des Tau-Proteins wird in einem Zusammenspiel mehrerer Kinasen und Phosphatverbindungen reguliert. Die gesteigerte Phosphorylierung bei der Alzheimer Erkrankung führt zu einer Sequestrierung normalen Tau-Proteins und anderer mikrotubuliassoziierter Proteine, die zu einem fehlerhaften Zusammenbau der Mikrotubuli führen und so den axonalen Transport stark beeinträchtigen. Hier entstehen paarige helikale Filamente (PHF), deren Einzelelemente hyperphosphoryliertes Tau-Protein enthalten. Auf diese Weise werden neuronale Funktion und Kommunikation über Synapsen grundlegend gestört. Damit verbunden ist eine Anhäufung unlöslichen Tau-Proteins, die zusätzlich die neuronale Funktion beeinträchtigt [Iqbal et al. 2005]. Die neurofibrillären Tangles sind schon in relativ frühen Krankheitsstadien im transenthorinalen Cortex zu finden. Mit Fortschreiten der Erkrankung betreffen sie auch den Hippokampus, die Amygdala und letztendlich auch den Neokortex [Braak et al. 1999]. Ob nun Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und Bildung neurofibrillärer Tangles Ursache oder Folge der Alzheimer Demenz sind, ist noch ungeklärt.

In Untersuchungen, die mögliche Wechselwirkungen zwischen Tau-Protein- und Plaquepathologie zum Gegenstand hatten, wurde vermutet, dass  $\beta$ -Amyloidablagerungen durch die Aktivierung spezifischer Kinasen zur gesteigerten Tau-Hyperphosphorylierung beitragen können [Maho et Yasuo 2002]. Zusätzlich scheinen diese Proteinablagerungen eine massive Entzündungsreaktion hervorzurufen, deren proinflammatorische Zytokine zusätzlich die Hyperphosphorylierung triggern. Darüber hinaus wird diskutiert, ob  $\beta$ -Amyloid durch Wechselwirkung mit dem Proteasom einer Degradation des Tau-Proteins entgegenwirkt [Blurton-Jones et Laferla 2006].

Eine weitere Theorie zur Entstehung der DAT ist die neurovaskuläre Hypothese, die – wie der Name schon sagt – zum Gegenstand hat, dass Dysfunktionen der das Gehirn versorgenden Blutgefäße auf der einen Seite zu einer Unterversorgung des

Gehirns mit Blut, und auf der anderen Seite zu einem gestörten Abtransport des  $\beta$ -Amyloids führen [Iadecola 2004]. Es herrscht jedoch noch Unstimmigkeit darüber, ob eine bestehende Gefäßpathologie Auslöser der Alzheimer Erkrankung sein kann oder nur als relativ unabhängiger Verstärker einer schon bestehenden Erkrankung anzusehen ist [Riekse et al. 2004, Snowden et al. 1997].

Im Jahre 1991 veröffentlichten Braak und Braak eine Stadieneinteilung der Pathologie neurofibrillärer Tangles beim M. Alzheimer [Braak et Braak 1991] und setzten diese mit den klinischen Symptomen in Beziehung [Braak et al. 2006, Braak et al. 1993]: Die neurofibrillären Tangles sind zu Anfang der Erkrankung, in einem noch symptomlosen Stadium, vor allem im Bereich des transentorhinalen und entorhinalen Kortex zu finden (Transentorhinale Stadien= Braak NFT I und II). Mit Fortschreiten der Erkrankung und eventuell dem Auftreten erster kognitiver Symptome dehnen sich die Tangles auf das limbische System aus und ihre Anzahl im medialen Temporallappen nimmt zu (Limbische Stadien= Braak NFT III und IV). In den Endstadien der manifesten Demenz weitet sich die Tau-Pathologie auf Assoziations- und Projektionsareale des Isokortex aus. Dies entspricht den Isokortikalen Stadien= Braak NFT V und VI.

Der Zusammenschluss einiger amerikanischer Gedächtnisambulanzen zu dem so genannten ‚Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease‘ (CERAD) brachte im Jahre 1986 eine Klassifikation der DAT heraus, die sich vor allem mit dem Auftreten neuritischer Plaques beschäftigt [Ellison et al. 2004]. Das Gehirn wird, gemäß des CERAD- Protokolls, nach der makroskopischen Begutachtung mikroskopisch in mindestens sechs histologischen Schnitten aus verschiedenen Gehirnregionen untersucht. Hierbei sind die in Paraffin eingebetteten Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin, Silberfärbung nach Bielschowsky, und eventuell auch Thioflavin-S und Kongorot zu färben. Dabei erfolgt bei semiquantitativer Auswertung die Zuordnung zu den Gruppen ‚keine Plaques‘, ‚wenig‘, ‚moderat‘, ‚häufig‘. Über eine Tabelle, die das Alter des Verstorbenen berücksichtigt, erfolgt dann die Einteilung in vier Gruppen (‚age- related plaque score‘): Gruppe O zeigt keinen histologischen Hinweise auf das Vorliegen einer DAT, Gruppe A zeigt unsichere histologische Zeichen der DAT, Gruppe B legt die Diagnose der DAT nahe, und Gruppe C macht diese Diagnose höchstwahrscheinlich [Ellison et al. 2004].

### 1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Die AD ist eine meist langsam fortschreitende Erkrankung mit einer allmählich einsetzenden Symptomatik. In den Anfangsstadien ist oft eine Gedächtnisstörung vorherrschend, im weiteren Verlauf treten dann häufig auch Störungen weiterer kognitiver Funktionen hinzu [Petersen et al. 1994]. Abweichungen in Form von früherer oder verstärkter Beeinträchtigung einzelner kognitiver Funktionen sind möglich. Darüber hinaus sind akzessorische psycho-pathologische Symptome zu beobachten, welche fluktuierend auftreten [Reisberg et al. 1992].

Es wird angenommen, dass neuropathologische Veränderungen des Gehirns schon 20-30 Jahre vor dem Auftreten klinischer Symptome entstehen können. Man geht davon aus, dass in dieser Phase eine stete Plaque- und Tanglevermehrung stattfindet, die, zuerst klinisch inapparent, ab einem bestimmten Grenzwert jedoch zu den ersten Symptomen führt. Dieses klinische Anfangsstadium wird als leichte kognitive Beeinträchtigung („mild cognitive impairment“, MCI) bezeichnet und ist definiert anhand subjektiver Patientenberichte über Gedächtnisverluste, welche durch objektive Messverfahren, verifiziert werden können [Petersen 2004]. Neben Patienten mit den Prodromi einer echten DAT können auch Patienten mit einer benignen Form der MCI im Sinne eines normalen Alterungsprozesses oder Patienten mit Frühsymptomen anderer Demenzformen betroffen sein [Gauthier et al. 2006].

Die kognitiven Symptome sind als klinisches Korrelat der anatomischen Verteilung von Nervenzelluntergänge und dem Ausfall des davon betroffenen funktionellen Hirnareals zu sehen. So konnte herausgefunden werden, dass die neuronale Degeneration im entorhinalen Kortex und im Hippocampus beginnen. Anschließend sind Läsionen auch auf den Neokortex ausgedehnt anzutreffen; im weiteren Verlauf sind häufig temporaler und parietaler Isokortex betroffen [Bondi et al. 1994, Braak et Braak 1991]. Kognitiven Symptome können sowohl Störungen des Gedächtnisses als auch des Denkvermögens, der Sprache (Aphasie), Orientierung (häufig zuerst zeitlich, dann räumlich, später situativ und eigene Person betreffend), Aufmerksamkeitsstörungen, Apraxie, Akalkulie, Agnosie, Störungen der Kritik- und Urteilsfähigkeit, sowie der Exekutivfunktion betreffen. Sie nehmen im Allgemeinen im weiteren Krankheitsverlauf langsam progredient zu und sind oftmals Anlass zur Ausbildung depressiver Symptome.

Defizite in der von der ICD-10 als obligat angesehenen Alltagskompetenz können anhand der sieben Stadien umfassenden FAST-Skala (Functional Assessment

STaging) beschrieben werden, beginnend mit einem asymptomatischen Stadium (Stadium 1) bis zu dem Verlust von Sprache und Beweglichkeit (Stadium 7).

Begleitende psychopathologische Symptome können häufig Wahn, Wahrnehmungsstörungen, Affektive Störungen, Antriebstörungen oder Störungen der Psychomotorik sein.

Auch somatische Symptome können bei der Alzheimer Erkrankung auftreten: Im Verlauf der frühen Stadien ist die Motorik jedoch oft noch nicht wesentlich eingeschränkt; erst im Endstadium kommt es zum Verlust des Gehvermögens und der Willkürmotorik, sowie zu Urin- und danach auch Stuhlinkontinenz [Reisberg et al. 1982].

#### **1.1.4 Diagnostik**

Die Diagnostik der AD zu Lebzeiten stützt sich im Wesentlichen auf die medizinische Vorgeschichte des Patienten im Zusammenspiel mit der klinischen, neurologischen und psychiatrischen Untersuchung und dem Ausschluss anderer Ursachen einer Demenz. Durch neuropsychologische Tests ist es möglich, schon relativ früh an Hinweise auf beginnende kognitive Störungen zu gelangen. Tests, wie beispielsweise der ‚Mini-Mental State Examination‘ (MMSE), können hier hilfreich sein, dürfen allerdings nie isoliert betrachtet werden. Die Erhebung bestimmter Laborparameter (z.B. Schilddrüsenwerte, Vit. B12) kann dazu dienen, sekundäre Ursachen des dementiellen Syndroms aufzudecken oder auszuschließen. Trotzdem gilt die neuropathologische Diagnostik immer noch als Goldstandard [McKhann et al. 1984]. Immer größere Bedeutung kommt der Früherkennung dieser Erkrankung zu, da nach heutigem Stand Behandlungskonzepte besser greifen, je früher sie eingesetzt werden und je geringer der schon verursachte neuronale Schaden ist [Morris 2006].

Der Ausschluss beispielsweise von Hirntumoren, zerebrovaskulären Erkrankungen, Infarkten oder subduralen Hämatomen als alternative Ursachen der dementiellen Symptomatik hat die bildgebenden Verfahren wie die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie immer mehr in den Mittelpunkt gerückt.

Der Stellenwert der Ausschlussdiagnostik ist nicht zuletzt durch die Diagnostikkriterien des NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke and the Alzheimer's Disease and related Disorders Association) begründet. Diese Kriterien, die vor ca. 20 Jahren aufgestellt

wurden, räumen dem Ausschluss anderer Demenzen eine wichtige Rolle ein [McKhann et al. 1984]. Daneben existiert eine zweite, momentan gebräuchliche Aufstellung von Diagnosekriterien: die des ‚Diagnostik and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition‘ (DSM-IV). Beide oben genannten Diagnoseschlüssel sind im Folgenden nach Yaari et al. 2007 aufgelistet:

**Zusammenfassung der DSM-IV Kriterien für die Diagnose der Alzheimer Demenz:**

- Beginn mit fortschreitender Abnahme kognitiver Fähigkeiten mit dem Ergebnis einer Beeinträchtigung der sozialen oder beruflichen Funktion von ehemals höherem Niveau
- Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses und mind. einer der folgenden kognitiven Leistungen: Aphasie, Apraxie, Agnosie, Exekutivfunktionen (Planen, Organisieren, Abstrahieren)
- Kognitive Defizite lassen sich nicht durch andere neurologische, psychiatrische, metabolische oder systemische Erkrankungen erklären.
- Kognitive Defizite treten nicht ausschließlich im Zustand des Delirs auf.

**Zusammenfassung der NINCDS-ADRDA Kriterien für die Diagnose der AD:**

- Wahrscheinliche AD: Defizite in zwei oder mehr kognitiven Leistungsbereichen, progressive Verschlechterung von Gedächtnis oder anderen kogn. Leistungen, erhaltenes Bewusstsein, Alter zwischen 40 und 90, Ausschluss von systemischen oder anderen Gehirnerkrankungen, die die Symptomatik erklären
- Mögliche AD: Atypischer Beginn, Präsentation oder klinischer Verlauf der Demenz, Nachweis einer anderen Erkrankung, die Demenz bei Pat. hervorrufen kann
- Gesicherte AD: Klinische Kriterien der wahrscheinlichen AD, entsprechende Gewebefunde bei Autopsie oder Biopsie

Tabelle 1.1 Diagnoseschlüssel nach DSM- IV und NINCDS-ADRDA

Eine nicht geringe Anzahl an Studien hat gezeigt, dass es möglich ist, durch MRI gemessene Atrophie in der Region des Hippokampus mit 80-90%iger Genauigkeit eine Unterscheidung zwischen einem an Alzheimer erkrankten Patienten und einer gleichaltrigen gesunden Person zu treffen [Henneman et al. 2009]. Ähnliche Erkenntnisse mit hoher Sensitivität lassen sich durch die 18F-Fluorodeoxyglukose (FDG) PET erzielen, die einen Hypometabolismus in der temporalen, parietalen und posterioren cingulären Kortexregion sichtbar macht [Jagust 2006]. Eine definitive Unterscheidung der verschiedenen Demenzformen untereinander ist bei beiden Verfahren jedoch nur schlecht möglich.

Ein weiteres Feld in der Erforschung diagnostischer Mittel betrifft die Aussagekraft möglicher Biomarker im Liquor. Im Fokus steht hier vor allem die Untersuchung des sog. Totalen Tau-Proteins (T-tau) und des A $\beta$ 42, der amyloidogensten Unterform dieses Proteins, im Liquor. Liquor T-tau ist bei DAT auf ca. 300% gegenüber dem Gesunden erhöht. Zehn große prospektive Studien erzielten eine Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 91% gegenüber kognitiv unauffälligen älteren Menschen [Blennow 2004]. Im Gegensatz dazu ließ sich bei DAT für A $\beta$ 42 im Liquor eine Reduktion um 50% nachweisen – möglicherweise Zeichen der vermehrten intrazerebralen Ablagerung und somit einer verminderten Liquordiffusion dieses Peptids. Hier wiesen sechs große prospektive Studien eine Sensitivität für die AD von 89% und eine Spezifität gegenüber kognitiv gesunden älteren Probanden von 90% auf [Blennow 2004]. Diese Parameter erlauben den Ausschluss einiger wichtiger Differentialdiagnosen wie der Depression oder der Parkinson Erkrankung; die Unterscheidung zwischen einer AD und anderen Demenzen, wie der Frontotemporalen oder der Lewy-Körper Demenz, ist jedoch noch mangelhaft [Blennow et Hampel 2003].

### **1.1.5 Therapie**

Pharmatherapeutika, die zur Behandlung der Demenz vom Alzheimer Typ eingesetzt werden, sind in drei Gruppen einzuteilen: Zum einen gibt es die durch Forschung im Bereich der Neurotransmitter entwickelten Medikamente mit überwiegend symptomatischen Effekten; zum anderen die Medikamente, die der molekularen Pathogenese Rechnung tragen und am ehesten ein so genanntes ‚disease modifying‘ Potential haben. Diese Arzneimittel befinden sich gegenwärtig noch im Stadium der klinischen Erprobung. Daneben gibt es, durch eine große Zahl an epidemiologischen Studien begründet, zusätzliche Medikamente, von denen einige schon in randomisierten Studien getestet wurden [Blennow et al. 2006].

Bei der symptomatischen Therapie stehen Acetylcholinesterase-Inhibitoren an erster Stelle. Gemäß der cholinergen Hypothese der AD, die die Degeneration cholinergischer Neurone im frontalen Gehirnbereichen als Ursache einer gestörten Acetylcholin-Konzentration in den Präsynapsen des Hippokampus sieht und somit für Gedächtnisstörungen und andere kognitive Symptome verantwortlich ist, wird mit ihrem Einsatz versucht, die Verfügbarkeit von Acetylcholin zu erhöhen [Terry et Buccafusco 2003]. Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil, Rivastigmin und Galantamin haben sich im klinischen Alltag, vor allem bei milder bis moderater

Krankheitsausprägung, bewährt. Eine Acetylcholinesterase-Inhibition kann nur eine zeitliche Linderung der Symptome bewirken, aber keine kurative Behandlung darstellen. Studien zu Folge profitierten Patienten davon über Zeiträume von zwei bis fünf Jahren [Bullock et al. 2005, Bullock et Dengiz 2005].

Eine weitere Pharmakagruppe, deren Wirkmechanismus auf Neurotransmitterbasis greift und somit symptomatisch eingesetzt wird, ist das Memantin. Unter dem Einfluss der Alzheimer Erkrankung besteht eine gesteigerte Glutamataktivität, die wiederum ihrerseits eine anhaltend niedrige Aktivierung der NMDA-Rezeptoren bedingt. Dies greift entscheidend in den Lern- und Gedächtnisprozess ein. Mit Memantin als einem nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten versucht man bei mittlerer bis schwerer Krankheitsausprägung eine Glutamat-induzierte Übererregung zu vermindern, ohne aber die physiologische Erregung dieses Rezeptors wesentlich zu beeinflussen [Areosa et al. 2005, Wilcock 2003]. Daneben wurde bei Kombinationstherapie mit Donepezil ebenfalls ein positiver synergistischer Effekt nachgewiesen [Tariot et al. 2004].

Psychopathologische Symptome, wie z.B. aggressive Episoden, psychomotorische Agitiertheit oder Psychosen, versucht man mit atypischen Neuroleptika zu behandeln. Diese weisen im Vergleich zu den typischen Neuroleptika weniger extrapyramidale Nebenwirkungen auf. Alternativ können Antikonvulsiva wie z.B. Valproat oder Carbamazepin und kurz wirksame Benzodiazepine wie Lorazepam oder Oxazepam gegeben werden [Masterman 2003].

Medikamente, die zu den krankheitsmodifizierenden Therapeutika gezählt werden, versuchen die A $\beta$ -Produktion und -Ablagerung zu drosseln und seine Entfernung aus dem Gehirn zu fördern. In diesem Sinne befinden sich Inhibitoren des  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1' (BACE1), Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase, sowie Stimulatoren der  $\alpha$ -Sekretase (z.B. Bryostatin) noch in der Entwicklung [Etcheberrigaray et al. 2004, Luo et al. 2001, Siemers et al. 2005].

Gegenstand der Forschung ist auch das mögliche Verhindern einer A $\beta$ -Ablagerung durch eine Immuntherapie mit A $\beta$ -Antikörpern. Eine zweite Generation dieses Impfstoffes befindet sich noch in Phase II der klinischen Testung, nachdem die erste Generation bei 6% der Probanden eine aseptische Enzephalitis hervorgerufen hatte [Bard et al. 2000, Orgogozo et al. 2003].

A $\beta$ -Fibrillisationsinhibitoren, welche die Entstehung der pathogenetisch bedeutsamen  $\beta$ -Faltblattstruktur des  $\beta$ -Proteins und anschließende Fibrillisation

verhindern, befinden sich ebenfalls noch in der klinischen Testung [Permanne et al. 2002].

Pharmaka, deren Anwendung auf Ergebnissen epidemiologischer Studien basieren und deren Wirkungsnachweis in kontrollierten klinischen Studien problematisch verlief, sind Anti-Inflammatorische Medikamente wie Nicht-Steroidale-Anti-Rheumatika (NSAR) oder selektive COX2 Inhibitoren, Cholesterin senkende Mittel (Statine), Östrogene oder Antioxidantien wie Vitamin E. Ihnen wird vor allem eine protektive Wirkung zugeschrieben. [Blennow et al. 2006]

Im Sinne der nichtpharmakologischen Behandlung ist darüber hinaus auf ein über die Krankheit gut informiertes Umfeld zu achten. Gefahrenquellen in der Wohnumgebung des Patienten sind nach Möglichkeit zu entschärfen, ein Identifikationsarmband kann in manchen Situationen von großem Nutzen sein [Yaari et Corey-Bloom 2007].

## **1.2 Charakteristika des physiologisch alternden Gehirns**

Auch Gehirne von älteren Menschen ohne kognitive Veränderungen einer DAT zeigen morphologische Veränderungen:

Makroskopisch imponiert zunächst eine allgemeine Verminderung des Gehirnvolumens, vor allem in Regionen des Frontallappens und des Hippokampus. Verbunden sind diese Substanzverluste mit einer Atrophie der Gyri, einer Abflachung des Sulcusreliefs und einer Erweiterung des Ventrikelsystems. Diese Veränderungen beginnen zumeist nach dem fünfzigsten Lebensjahr mit einem fortschreitenden cerebralen Gewichtsverlust von 2-3% pro Dekade, wobei diese Verluste sowohl die weiße, als auch die graue Substanz betreffen [Anderton 1997]. Studien konnten allerdings mit Hilfe der Magnetresonanztomographie nachweisen, dass sich das Verhältnis von grauer zu weißer Substanz während des Alterungsprozesses verändert: So ist ab einem Alter von fünfzig Jahren ein relativ größerer Verlust von weißer Substanz zu beobachten [Harris et al. 1994]. Genaue Schätzungen der Nervenzellverluste sind hier offenkundig schwer zu realisieren, zumal von einzelnen Autoren auch diskutiert wird, ob es sich hierbei statt um einen Verlust nicht vielmehr um ein Schrumpfen von Neuronen handeln könnte [Esiri et al. 1997].

Neben den makroskopischen Besonderheiten des alternden Gehirns zeigen sich auch eine Reihe von histologischen Veränderungen, von denen einige auch bei der Diagnostik des M. Alzheimer eine entscheidende Rolle spielen:

Neurofibrilläre Tangles und senile Plaques sind zwar pathogenetisch eng mit dem Morbus Alzheimer verknüpft, sie finden sich jedoch auch in den Gehirnen von nicht-dementen älteren Menschen.

Es können einzelne neurofibrilläre Tangles in nahezu allen Gehirnen nicht-dementer älterer Patienten nachgewiesen werden, ihre Dichte ist im Vergleich zu DAT Gehirnen eher gering und ihre Ausdehnung vor allem auf Hippokampus, Amygdala und die transentorhinale Region beschränkt [Anderton 2002].

Studien zeigen, dass auch ein mittelschwerer Befall des entorhinalen Kortex und des CA1 Feldes des Hippokampus durchaus mit einem normalen kognitiven Status einhergehen kann. Schwerwiegende pathologische Veränderungen im inferioren temporalen Neokortex wurden nur bei dementen Patienten beobachtet, was den Schluss nahe legt, dass das Vorkommen von neurofibrillären Tangles in neokortikalen Regionen ein wichtiger Faktor für die klinische Ausprägung einer Demenz ist [Bouras et al. 1994].

Darüber hinaus kann man, wie schon angedeutet, in Gehirnen physiologisch alternder Menschen Plaquestrukturen identifizieren. Aber auch diese sind, ebenso wie die Tangles, im Vergleich zum Morbus Alzheimer von wesentlich geringerer Zahl. Untersuchungen wiesen bei solchen Patientenkollektiven vor allem neokortikale Plaques nach [Schmitt et al. 2000].

An dieser Stelle sei auf die sogenannte ‚Nun Study‘ hingewiesen. Hier wurden zwischen 1991 und 1998 amerikanische Nonnen zwischen 75 und 107 Jahren im Rahmen einer Längsschnittstudie untersucht. Neben Erkenntnissen im Hinblick auf das sogenannte ‚healthy ageing‘ konnten hier Fälle neuropathologisch ausgeprägter Alzheimer-Veränderungen bei jedoch wiederholt unauffälliger psychokognitiver Testung dokumentiert werden [Snowdon 1997, Tyas et al 2007].

Weitere Studien, deren Kollektiv aus nicht-dementen älteren Menschen bestand, ergaben, dass senile Plaques während eines physiologischen Alterungsprozesses nicht unbegrenzt akkumulieren, sondern dass der Plaquebestand sich innerhalb einer gewissen begrenzten Zeitspanne aufbaut, um sich dann auf einem bestimmten Level zu stabilisieren [Mackenzie 1994]. Auch die Plaquemorphologie scheint hier von Bedeutung zu sein; so ist sämtlichen Untersuchungen gemeinsam, dass die gefundenen Plaques vom diffusen Typ waren [Mackenzie 1994, Morris et al. 1996,

Price et al.1991]. Immunhistologisch scheinen hier solche Plaques zu dominieren, die positiv für die Antikörper ChromograninA und Ubiquitin, jedoch negativ für Tau-Protein sind [Duyckaerts et al. 2009, Wang und Munoz 1995]: Eine Charakterisierung, die man aus Untersuchungen des Morbus Alzheimer kennt, bei dem sie jedoch zu den „neuritischen Abnormalitäten“ gezählt werden und somit hier eher nicht zu dominieren scheinen [Ellison et al. 2004]. Die Erkenntnisse hinsichtlich der Plaquemorphologie und ihrer Immunreaktivität sind noch unvollständig und werden zum Teil kontrovers interpretiert.

### **1.3 Fragestellung**

Gibt es Unterschiede im immunhistochemischen Markierungsmuster seniler Plaques bei DAT und nicht-dementen älteren Menschen?

Wenn dies der Fall ist, lassen sich diese Unterschiede im Hinblick auf die Immunhistologie und Morphologie genauer charakterisieren?

Lassen sich dadurch Aussagen über die mögliche pathogenetische Bedeutung einer ChromograninA-Immunreaktivität in senilen Plaques machen?

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Für die Auswahl des Patientenkollektivs stand das Autopsiearchiv des Instituts für Neuropathologie der Universität Gießen zur Verfügung, wobei die Jahrgänge 1986-2007 für die vorliegende Studie ausgewertet wurden.

Die Auswahl der Fälle für die vorliegende Arbeit richtete sich nach klinischen und neuropathologischen Kriterien: In das Patientenkollektiv der an Alzheimer Erkrankten wurden nur solche Patienten eingeschlossen, die sowohl eine klinisch bekannte Demenz auf dem Sektionsprotokoll, als auch eine neuropathologisch verifizierte Alzheimerpathologie aufwiesen. Die entsprechenden Fälle wurden histomorphologisch reevaluiert und nach der CERAD und Braak-Klassifikation klassifiziert [Ellison et al. 2004].

Das nach den beschriebenen Kriterien ausgewählte Untersuchungskollektiv der Alzheimererkrankten umfasst somit 41 Patienten, von denen 23 weiblichen und 18 männlichen Geschlechts sind. Das arithmetische Mittel in dieser Gruppe beträgt 78 Jahre, mit einer Variationsbreite von 55 bis 95 Jahren und einem Median von ebenfalls 78 Jahren.

Ein Kollektiv von 10 Sektionsfällen ohne Demenzanamnese bei fehlender klinischer und neuropathologischer Alzheimerdiagnose dient hierbei als Kontrollgruppe. Ein weiteres Kriterium für Aufnahme in die Kontrollgruppe war der Nachweis einzelner  $\beta$ -Amyloid positiver Plaques in der neuropathologischen Untersuchung, bei gleichzeitigem Fehlen jeglicher Hinweise auf eine Erkrankung aus dem dementiellen Formenkreis in der klinischen Befundbeschreibung. Das arithmetisch gemittelte Alter der Kontrollgruppe liegt ebenfalls bei 78 Jahren, mit einer Variationsbreite von 69 bis 86 Jahren und einem Median (m) von 75<m>82 Jahren. Die Zuordnung der verschiedenen Fälle zu CERAD- und Braak-Stadien ist der Tabelle 5.3 und 5.4 im Anhang zu entnehmen.

Patienten, bei denen Tumorerkrankungen oder andere schwerwiegende Systemerkrankungen, beispielsweise HIV oder Lupus Erythematodes, auf dem Sektionsprotokoll dokumentiert sind, wurden ausgeschlossen. Ebenso Patienten mit vorbestehenden Erkrankungen des zentralen Nervensystems oder beschriebener Störung aus dem psychiatrischen Krankheitsbereich.

Genauere Angaben zu den Sektionsfällen sind Tabelle 5.5 und 5.6 im Anhang zu entnehmen.

## 2.2 Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben entstammen dem Archiv des Instituts für Neuropathologie der Universität Gießen. Die Gewinnung des Gewebes für die Paraffineinbettung geschieht folgendermaßen:

Die bei der Sektion entnommenen Gehirne werden zunächst in der Regel für mindestens vier Wochen in Formalin fixiert und anschließend dann bei der Obduktion in frontale Schnitte zerlegt. Danach erfolgt die Entnahme der Proben für die Paraffineinbettung.

Untersucht wurden Proben aus dem Kortex des Lobus frontalis, aus dem Hippocampus und aus dem Kortex des Occipitallappens (Area striata).

Allerdings lagen nicht bei allen Fällen Gewebeproben sämtlicher zu untersuchender Regionen vor. Diese Fälle sind im Anhang in der Tabelle 5.1 und 5.2 gekennzeichnet. Bei den 41 DAT-Fällen fehlten einmal 2 Paraffinblöcke und zwölfmal ein Paraffinblock, bei den 10 Kontrollfällen fehlte einmal ein Paraffinblock.

## 2.3 Immunhistologie

Außer mit der konventionellen Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurden Serienschnitte der einzelnen Paraffinblöcke in festgelegter Folge der Schnitte mit 5 verschiedenen Antikörpern unter Mitführung von Positivkontrollen immunhistologisch untersucht. Die verwendeten Antikörper sind in der Reihenfolge wie die Untersuchungen an den Serienschnitten durchgeführt wurden (erster Antikörper = erster Serienschnitt, zweiter Antikörper = zweiter Serienschnitt etc.) in der folgenden Übersicht aufgeführt.

### 2.3.1 Verwendete Antikörper

Antigen	AK-Klon	Monoklonal/ Polyklonal	Ig-Klasse	Herkunft	Verd.	Vorbehandlung	Hersteller
Tau-Protein		Polyklonal		Kaninchen	1:800	Nein	DAKO
PHF-Tauprotein	AT8	Monoklonal	Ig-G1k	Maus	1:500	Nein	Innogenetics

β-Amyloid	6F/3D	Monoklonal	Ig-G1	Maus	1:50	Inkubation in 98%- 100% Ameisensäure für 3min.	Vision biosystems novocastra
Ubiquitin		Polyklonal		Kaninchen	1:100	Nein	DAKO
Chromogranin A	DAK-A3	Monoklonal	IgG2 κ	Maus	1:200	Kochen in Citratpuffer für 15 min	DAKO

Übersicht 2.1 Verwendete Antikörper

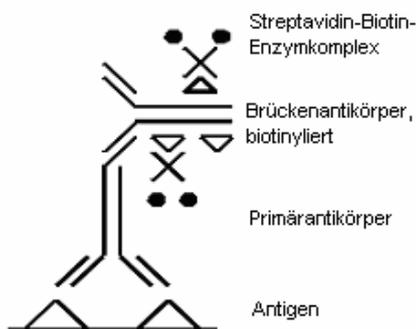


Abbildung 2.1 Anordnung von Bindungspartnern der ABC-Methode

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden mit der Streptavidin- Biotin-Complex (StreptABC)-Methode durchgeführt, die sich die starke Affinität von Streptavidin für Biotin zunutze macht. Bei der StreptABC-Methode arbeitet man mit einem biotinylierten Zweitantikörper (Brückenantikörper), der gegen den mit dem gesuchten Antigen reagierenden Primärantikörper (Maus- oder Kaninchen-Immunglobulin) gerichtet ist. An

den biotinylierten Zweitantikörper bindet sich kovalent ein Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex (siehe Abbildung 2.1). Als Enzym wird Meerrettich-Peroxidase

(horseradishperoxidase, HRP) verwendet. Diese reagiert mit dem als Chromogen eingesetzten 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), wodurch in einer Oxidationsreaktion (siehe Abbildung 2.2) DAB ein braunes, in organischen Lösungsmitteln schwer lösliches Präzipitat bildet und so das gesuchte Antigen im Gewebe sichtbar gemacht wird [Boenisch et al. 2003].

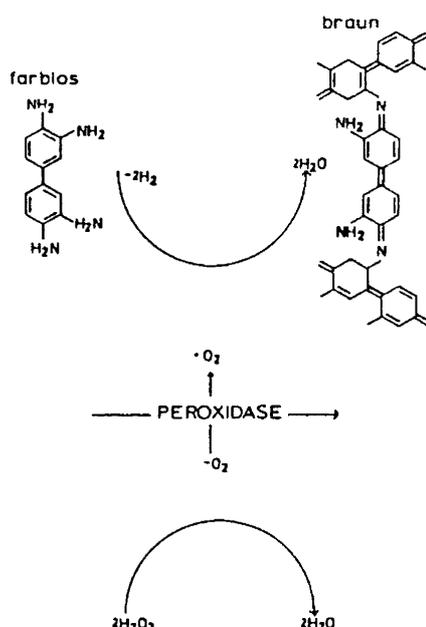


Abbildung 2.2 DAB-Reaktion

Folgende Reagenzien wurden bei der StreptABC-Methode verwendet:

Reagens A	Streptavidin, DAKO K 492	1ml Streptavidin in 0,01 mol/l phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, 15 mmol/l NaN <sub>3</sub> , pH 7,2
Reagens B	Biot. Peroxidase, DAKO K 492	1ml biotinylierte Meerrettich- Peroxidase in 0,01 mol/l phosphatgepufferter physiol. Kochsalzlösung, 15 mmol/l NaN <sub>3</sub> , pH 7,2
Reagens C	Biot. Ziegen- Anti- Maus/Kaninchen Ig, DAKO K 492	1ml biotinylierte, affinitätsisolierter Ziegen- Antikörper zu Maus- /Kaninchen- Ig in 0,01 mol/l phosphatgepufferter physiol. Kochsalzlösung, 15mmol/l NaN <sub>3</sub> , pH 7,2
Goat Serum	Ziegenserum, DAKO X 907	Pool unverdünnten Ziegenserums in flüssiger Form, 15mmol/l NaN <sub>3</sub> , pH 7,2

Tabelle 2.2 Bei der ABC-Methode verwendete Reagenzien [Dako 2008]

[A, B und C Reagens enthalten in DAKO®StreptAB-Komplex/HRP-Duett (Maus/Kaninchen), Kit Code K492]

Die Gebrauchslösungen des biotinylierten Brückenantikörpers und des Strept-ABC-Komplex/HRP werden vor der Verwendung im Verhältnis 1:100 mit 0,75% ALB-PBS verdünnt. DAB wird kurz vor Gebrauch in sechsfacher Menge PBS gelöst; anschließend erfolgt dann die Zugabe von 120 µl 30% Wasserstoffperoxid pro 60mg DAB.

### 2.3.2 Durchführung der immunhistologischen Untersuchungen

Zur immunhistochemischen Färbung mit DAKO®-StreptABC-Komplex/HRP-Duett werden folgende Puffer im Voraus angesetzt:

Pufferstammlösung	8g Di- Natriumhydrogenphosphat 1,3g Kalium- Dihydrogenphosphat 36,0g Natriumchlorid in 500ml A.dest lösen, pH=7,4 +/- 0,1
Waschpuffer	Stammlösung 1:10 verdünnt, pH=7,4 +/- 0,1 100ml Pufferstammlösung + 900ml A.dest.+ ca. 1ml Triton X 100 (Detergens, verbessert Lösungslaufeigenschaften während Coverplatesbenutzung)
Antikörperverdünnungspuffer	0,75% Albumin- PBS- Lösung, pH=7,4 +/- 0,1
Citratpuffer	2,1 g Zitronensäure in 975 ml A. dest gelöst, 25 ml 1 M Natronlauge, pH=6,0(+/- 0,1)

Tabelle 2.3 Verwendete Puffer

Die immunhistologischen Färbungen wurden an 5 µm dicken Paraffinschnitten des Untersuchungsgewebes sowie an Positivkontrollen für jeden Primärantikörper durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden in Aqua dest. Ohne Zusätze auf Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen.

Die durchgeführten Arbeitsschritte im Einzelnen:

- Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe (96%, 80%, 70%, 50% Aqua. dest.) je 5 min, danach Verbleiben der Präparate in Aqua dest.
- Vorbehandlung zur Antigendemaskierung:
  - Ameisensäurevorbehandlung bei β-Amyloid: 3 min in 99% Ameisensäure bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend 3x mit PBS spülen
  - Kochen in Citratpuffer bei ChromograninA: 15 min, dann 20 min abkühlen lassen.
  - Restl. AK ohne Vorbehandlung Verbleiben in PBS
- 8 min 3% Wasserstoffperoxid zur Blockierung der endogene Peroxidase, 3x spülen mit A. dest, 2x spülen mit PBS- Triton
- Einspannen der Präparate in Sequenza-Immuncenter, 1x spülen mit PBS ohne Triton, 1x spülen mit PBS+ Triton
- 20min Inkubation mit normalem Goatserum (Ziegen Serum) (Dako X 907) 1:20 verdünnt mit 0,75% Alb.-PBS-Lösung, danach nicht spülen
- 60 min Inkubation mit Primärantikörper (Verdünnungsverhältnisse in Übersicht) in 0,75% Alb.- PBS- Lsg, 2x spülen mit PBS- Triton
- 30 min Brücken-Ak (Flasche C im Kit 1:100 in 0,75% Alb.- PBS), 2x spülen mit PBS- Triton
- 25-30 min Inkubation mit StreptAB- Komplex (1:100 in 0,75% Alb.- PBS), 2x spülen mit PBS
- Präparate in Glasküvette mit PBS
- 6 min entwickeln mit DAB- Substrat, 3x spülen mit A.dest
- Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 2 min
- Präparate für 2 min in Leitungswasser
- Aufsteigende Alkoholreihe, Verbleiben der Präparate in Xylol
- Eindeckeln in ZytosealXYL (xylolbasierend, Fa. Richard- Allan Scientific)

## 2.4 Befundauswertung

Die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Präparate erfolgte mit dem Lichtmikroskop.

Zunächst wurde ein Verfahren zur semiquantitativen Bestimmung der Dichte der senilen Plaques in den mit verschiedenen Antikörpern untersuchten Schnittpräparaten entwickelt.

Hierzu wurde semiquantitativ ausgewertet, welchen ungefähren prozentualen Anteil die mit dem jeweiligen Antikörper markierten senilen Plaques an der Gesamtfläche der kortikalen Hirnsubstanz im gesamten Präparat einnehmen. Die Ergebnisse wurden in folgende 6 Gruppen (von – bis 5+) unterteilt

- [0%], 1+ [1-5%], 2+ [6-25%], 3+ [26-50%], 4+ [51-75%], 5+ [76-100%]

Dies wurde einheitlich für alle DAT- und Kontrollfälle durchgeführt.

Zunächst wurden in der ChromograninA-Immunhistologie in den einzelnen Fällen jeweils mindestens ein immunreaktiver Plaque pro Paraffinschnittpräparat, also mindestens drei senile Plaques pro Fall herausgesucht und auf dem Objektträger rot markiert.

Es wurden solche Plaques gewählt, die an gut zu identifizierenden Stellen im Schnittpräparat (z. B. in der Nähe eines prominenten Gefäßes oder eines Sulcus etc.) liegen, um den selben Plaque in den korrespondierenden Paraffinschnitten mit anderen Antikörperreaktionen gut wiederzufinden und sein Markierungsmuster mit den verschiedenen Antikörpern vergleichen zu können. Eine positive Immunreaktion mit einem Antikörper wurde mit „+“, ein negativer Reaktionsausfall mit „-“ vermerkt. Die Zuordnung der Plaques zu einem bestimmten Plaquetyp richtete sich im Wesentlichen nach dem Befund der  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie.

In gleicher Weise wurden Untersuchungen ausgehend von AT8-positiven senilen Plaques durchgeführt. Zuerst wurden AT8-positive senile Plaques an gut zu identifizierenden Stellen im histologischen Schnittpräparat markiert und danach wurden die entsprechenden Areale in den mit den übrigen Antikörpern gefärbten Schnitten überprüft. Eine vorhandene Immunreaktivität wurde mit „+“, eine fehlende Immunreaktivität mit „-“ vermerkt.

Die Befunde mit dem polyklonalen Antikörper gegen Tau-Protein wurden zwar jeweils ausgewertet, aber es ergab sich immer eine identische oder geringer ausgeprägte Immunreaktivität im Vergleich mit der AT8-Immunhistologie gegen PHF-Tau-Protein, daher werden im Ergebnisteil aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die

Ergebnisse der AT8-Immunhistologie dargestellt. Näheres ist im Diskussionsteil erläutert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Dichte immunreaktiver Plaques

##### 3.1.1 DAT-Fälle

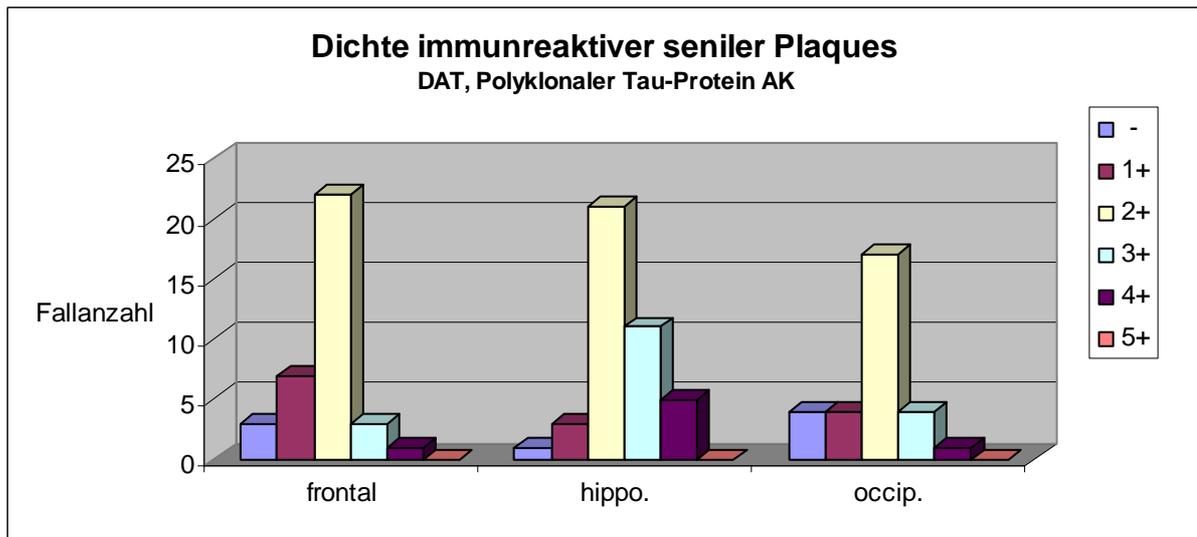


Abbildung 3.1

Polyklonaler Tau-Protein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	36 (100%)	41 (100%)	30 (100%)
-	3 (8,3%)	1 (2,4%)	4 (13,3%)
1+	7 (19,4%)	3 (7,3%)	4 (13,3%)
2+	22 (61,1%)	21 (51,2%)	17 (56,7%)
3+	3 (8,3%)	11 (26,8%)	4 (13,3%)
4+	1 (2,8%)	5 (12,2%)	1 (3,3%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.1

In der Tau-Immunhistologie findet sich, wie Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1 zu entnehmen ist, eine sowohl frontal, als auch hippokampal und okzipital relativ ausgeglichene Plaquedichte, mit einer Häufung in der Gruppe 2+. In den frontalen Schnitten befinden sich 61% der 36 Präparate in oben angegebenem Bereich, in

hippokampalen Schnitten vereint die Gruppe 2+ 51% der 41 Präparate, von den okzipitalen Schnitten sind 57% der 30 Präparate hier vertreten.

In vier okzipitalen Schnitten kann kein Plaquevorkommen nachgewiesen werden. Dies ist bei drei frontalen und einem hippokampalen Schnitt der Fall. Fehlende Präparate sind darunter nicht subsumiert.

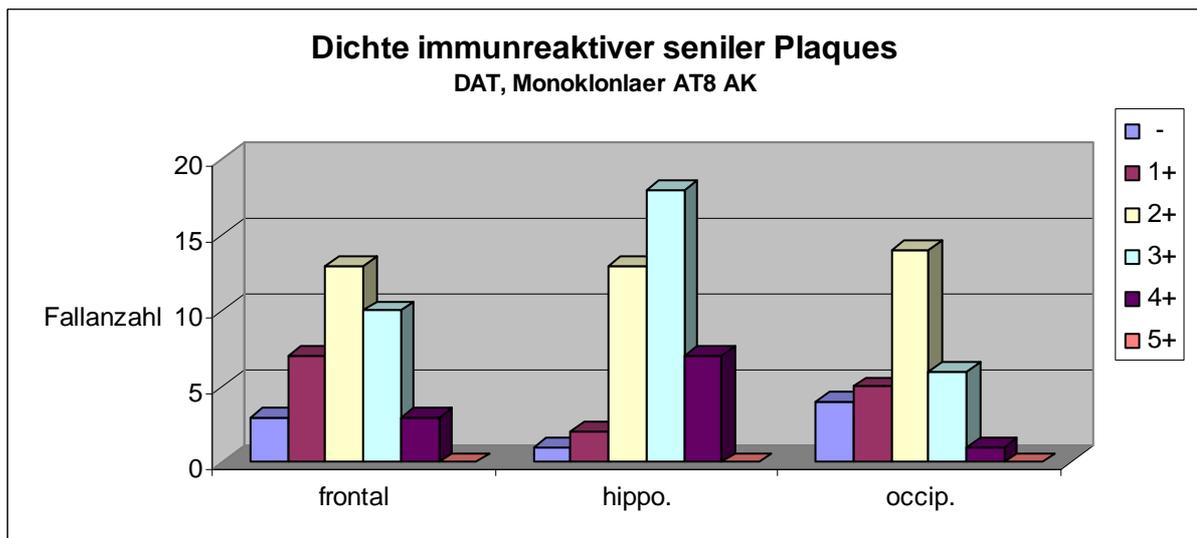


Abbildung 3.2

Monoklonaler AT8 AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	36 (100%)	41 (100%)	30 (100%)
-	3 (8,3%)	1 (2,4%)	4 (13,3%)
1+	7 (19,4%)	2 (4,9%)	5 (16,7%)
2+	13 (36,1%)	13 (31,7%)	14 (46,7%)
3+	10 (27,8%)	18 (43,9%)	6 (20%)
4+	3 (8,3%)	7 (17,1%)	1 (3,3%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.2

Tabelle 3.2 und Abbildung 3.2 kann entnommen werden, dass in der AT8-Immunhistologie frontal mit 36% von 36 und okzipital mit 47% von 30 Präparaten die Mehrheit der Präparate in die Gruppe 2+ einzuordnen ist. In diesem Falle scheinen jedoch Plaques betont im Bereich des Hippokampus detektiert werden zu können: Die Mehrheit, nämlich 44% der 41 Präparate, zeigt hier eine Plaquehäufigkeit von 3+.

Analog zur Tau-Immunhistologie können auch durch den AT8-Antikörper in vier okzipitalen, drei frontalen Schnitten sowie einem hippokampalen Schnitt keine Plaques gefunden werden.

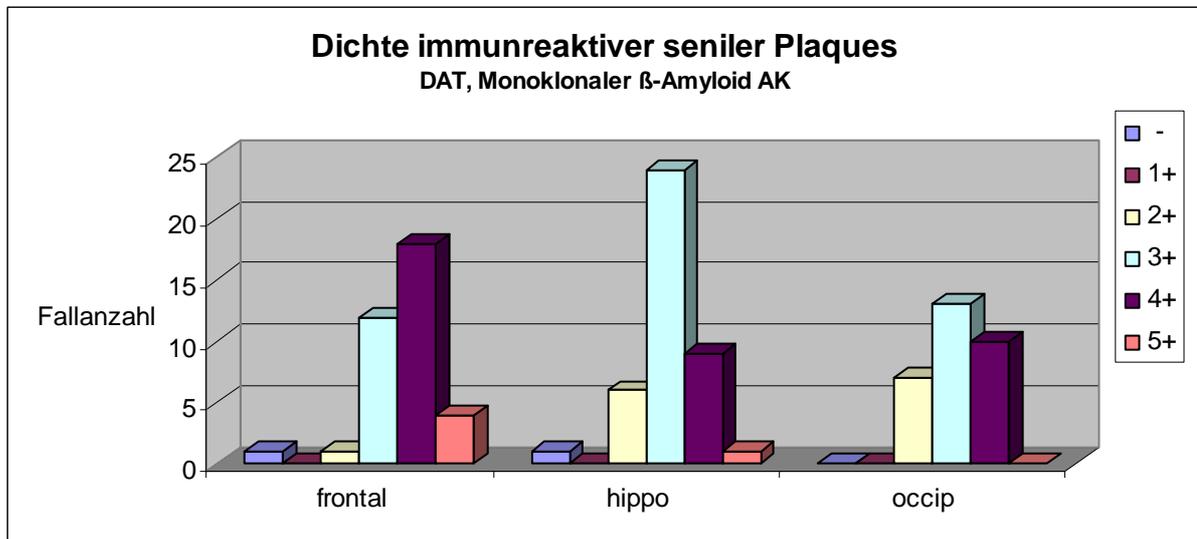


Abbildung 3.3

Monoklonaler $\beta$ -Amyloid AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	Frontal	Hippo	Occip
$\Sigma$	36 (100%)	41 (100%)	30 (100%)
-	1 (2,8%)	1 (2,4%)	0 (0%)
1+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
2+	1 (2,8%)	6 (14,6%)	7 (23,3%)
3+	12 (33,3%)	24 (58,5%)	13 (43,3%)
4+	18 (50%)	9 (22%)	10 (33,3%)
5+	4 (11,1%)	1 (2,4%)	0 (0%)

Tabelle 3.3

Erwartungsgemäß zeigt, so Tabelle 3.3 und Abbildung 3.3, die  $\beta$ -Immunhistologie eine Betonung höherer Plaquedichten. So können mehrheitlich im Bereich des Hippokampus 24% und okzipital 13% der Präparate der Gruppe 3+ zugeordnet werden. Im Vergleich dazu zeigt sich in frontalen Schnitten in 18% der Fälle sogar eine Plaqueshäufigkeit von 4+, vier Schnitte können darüber hinaus in die Gruppe der höchsten Plaquesdichte 5+ eingeordnet werden.

Es liegt hier im Hinblick auf die Plaquesdichte eine diskrete Betonung frontaler Regionen vor.

Lediglich in einem frontalen und einem hippokampalen Präparat kann kein Plaque beobachtet werden.

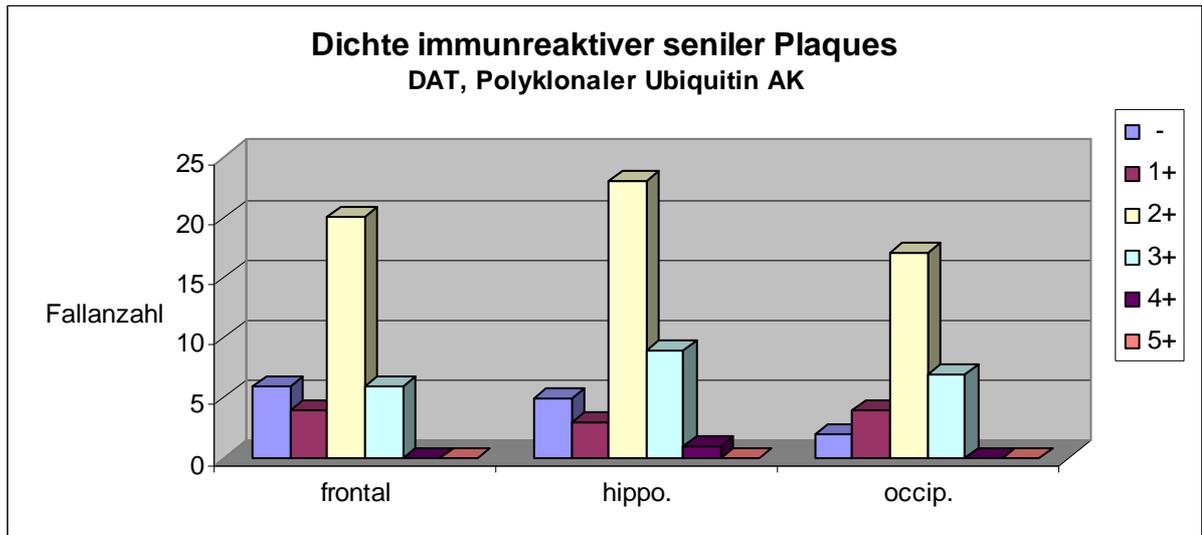


Abbildung 3.4

Polyklonaler Ubiquitin AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	Frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	36 (100%)	41 (100%)	30 (100%)
-	6 (16,7%)	5 (12,2%)	2 (6,7%)
1+	4 (11,1%)	3 (7,3%)	4 (13,3%)
2+	20 (55,6%)	23 (56,1%)	17 (56,7%)
3+	6 (16,7%)	9 (22%)	7 (23,3%)
4+	0 (0%)	1 (2,4%)	0 (0%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.4

Die Ubiquitin-Immunhistologie zeigt, wie Tabelle 3.4 und Abbildung 3.4 zu entnehmen ist, im Hinblick auf die Plauehäufigkeit ein homogeneres Bild: 57% der okzipitalen, und jeweils 56% der frontalen und hippokampalen Präparate weisen eine Plauehäufigkeit von 2+ auf.

Sechs frontale, fünf hippokampale und zwei okzipitale Präparate zeigen keine Plaues.

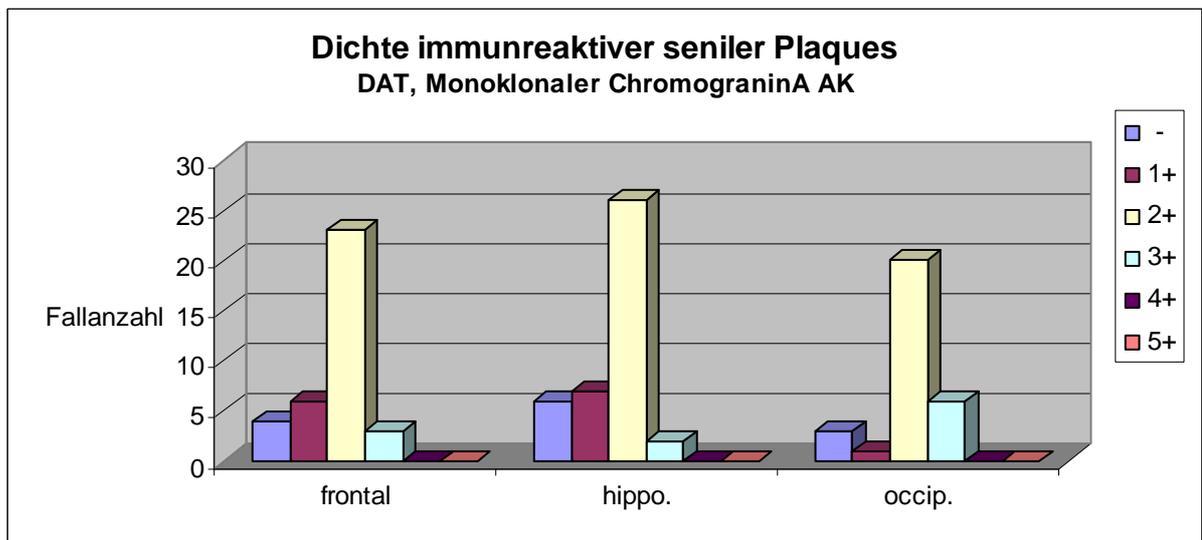


Abbildung 3.5

Monoklonaler ChromograninA AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	36 (100%)	41 (100%)	30 (100%)
-	4 (11,1%)	6 (14,6%)	3 (10%)
1+	6 (16,7%)	7 (17,1%)	1 (3,3%)
2+	23 (63,9%)	26 (63,4%)	20 (66,7%)
3+	3 (8,3%)	2 (4,9%)	6 (20%)
4+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.5

Auch im Falle der ChromograninA-Immunhistologie zeichnet sich ein ausgewogenes Bild der Plaquedichte im Bezug auf die drei untersuchten Hirnregionen ab. Tabelle 3.5 und Abbildung 3.5 zeigen, dass der jeweils größte Teil, nämlich 26% der Schnitte aus dem Hippokampus, 23% aus frontalen und 20% aus okzipitalen Regionen, der Gruppe 2+ zuzuordnen ist. Hier können keine Präparate mit einer Plaquedichte von 4+ oder 5+ detektiert werden.

In sechs hippokampalen, vier frontalen und drei okzipitalen Schnitten zeigt sich kein Plaquevorkommen.

### 3.1.2 Kontrollfälle

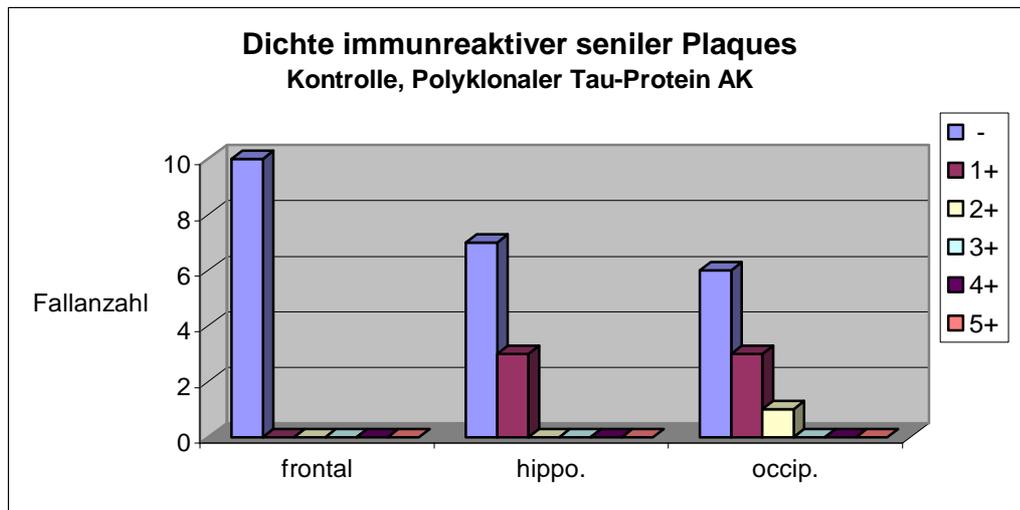


Abbildung 3.6

Polyklonaler Tau-Protein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	Hippo.	occip.
$\Sigma$	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
-	10 (100%)	7 (70%)	6 (60%)
1+	0 (0%)	3 (30%)	3 (30%)
2+	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)
3+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.6

Tabelle 3.6 und Abbildung 3.6 zeigen, dass sich in der Tau-Immunhistologie des Kollektivs der nicht-dementen älteren Menschen in nur 30% der hippokampalen und okzipitalen Präparate Plaques in der geringsten Dichte von 1+ finden, ein Präparat aus der okzipitalen Region weist eine Plaquehäufigkeit von 2+ auf; 100% der frontalen, 70% der hippokampalen und 60% der okzipitalen Schnitte sind ohne ein feststellbares Plaquevorkommen.

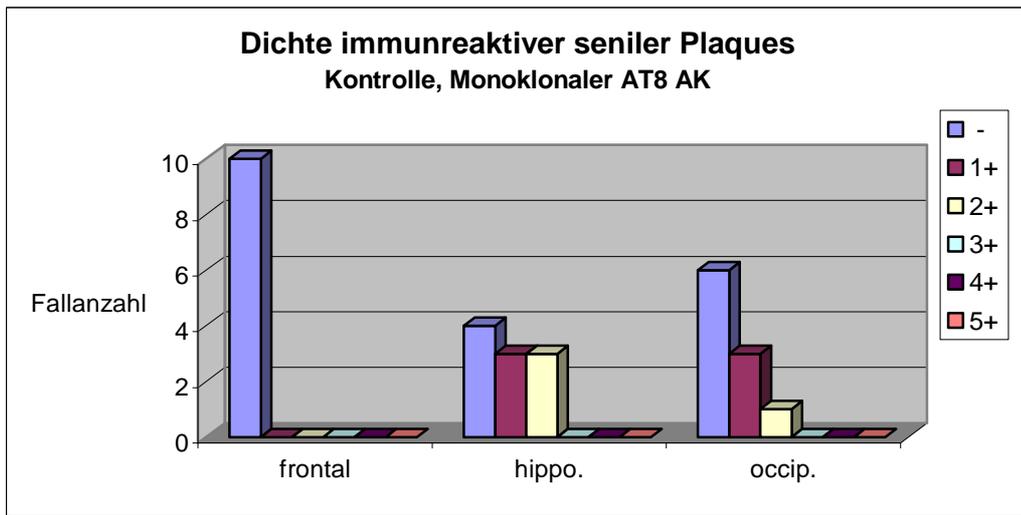


Abbildung 3.7

Monoklonaler AT8 AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	Frontal	Hippo.	occip.
$\Sigma$	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
-	10 (100%)	4 (40%)	6 (60%)
1+	0 (0%)	3 (30%)	3 (30%)
2+	0 (0%)	3 (30%)	1 (10%)
3+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.7

Etwas mehr Plaques können durch die AT8-Immunhistologie detektiert werden. Gemäß Tabelle 3.7 und Abbildung 3.7 lassen sich hier 30% der hippokampalen und 10% der okzipitalen Schnitte der Gruppe 2+ zuordnen. Jeweils 30% der Schnitte aus Hippokampus und okzipitalem Kortex weisen eine Plauehäufigkeit von 1+ auf.

100% der frontalen, 60% der okzipitalen und 40% der hippokampalen Präparate zeigen auch in der AT8-Immunhistologie keine Plaques.

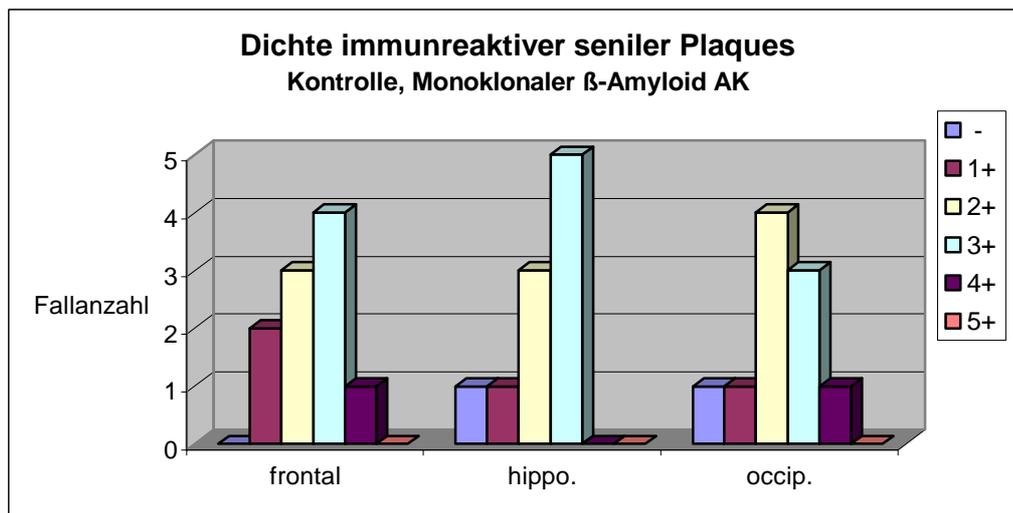


Abbildung 3.8

Monoklonaler $\beta$ -Amyloid AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
-	0 (0%)	1 (10%)	1 (10%)
1+	2 (20%)	1 (10%)	1 (10%)
2+	3 (30%)	3 (30%)	4 (40%)
3+	4 (40%)	5 (50%)	3 (30%)
4+	1 (10%)	0 (0%)	1 (10%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.8

Die  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie wiederum zeigt, wie in Tabelle 3.8 aufgelistet und in Abbildung 3.8 dargestellt, eine Betonung höherer Plaquedichten. Hier sind 50% der hippokampalen Schnitte und 40% der frontalen Präparate der Häufigkeitsgruppe 3+ zuzuordnen. 40% der aus okzipitalem Kortex entnommenen Präparate weisen eine Plauehäufigkeit von 40% auf. Jeweils ein Präparat aus frontalem und okzipitalem Kortex zeigt eine Dichte von 4+.

Lediglich ein Präparat hippokampal und okzipital ist ohne feststellbares Plauevorkommen.

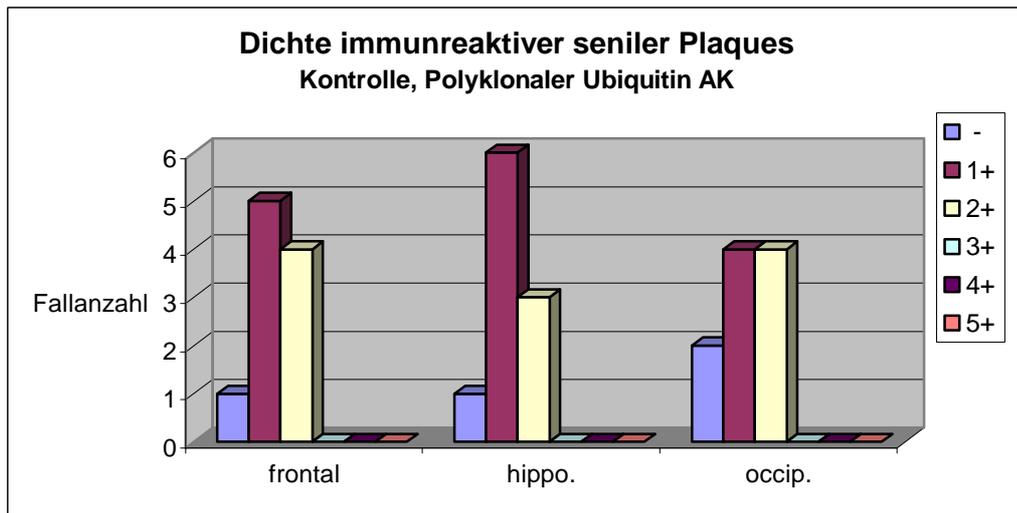


Abbildung 3.9

Polyklonaler Ubiquitin AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
-	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)
1+	5 (50%)	6 (60%)	4 (40%)
2+	4 (40%)	3 (30%)	4 (40%)
3+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.9

In der Ubiquitin-Immunhistologie ist eine Betonung der Häufigkeitsgruppe 1+ zu verzeichnen. Tabelle 3.9 und Abbildung 3.9 ist zu entnehmen, dass in diese Gruppe 60% der hippokampalen, 50% der frontalen und 40% der okzipitalen Schnitte eingeordnet werden können. Ebenfalls 40% der okzipitalen und frontalen Präparate, sowie 30% der hippokampalen weisen eine Plauehäufigkeit von 2+ auf. Ein häufigeres Plauevorkommen, d.h. 4+ oder 5+, kann hier nicht festgestellt werden.

Jeweils ein Präparat aus frontalem Kortex und Hippokampus sowie zwei okzipitale Präparate haben keinen Ubiquitin-positiven Plaue.

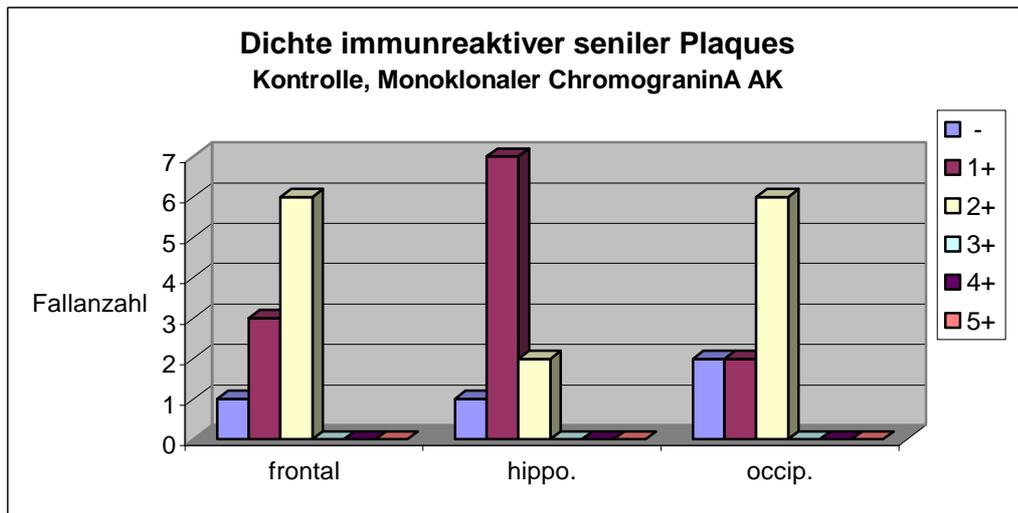


Abbildung 3.10

Monoklonaler ChromograninA AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
-	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)
1+	3 (30%)	7 (70%)	2 (20%)
2+	6 (60%)	2 (20%)	6 (60%)
3+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
4+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
5+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 3.10

Die ChromograninA-Immunhistologie weist im Falle der frontalen und okzipitalen Schnitte eine Betonung der Plauehäufigkeit von 2+ auf. So können, wie in Tabelle 3.10 und Abbildung 3.10 ersichtlich ist, hier jeweils 60% der Präparate eingruppiert werden. Die Mehrheit der hippokampalen Schnitte mit 70% ist der etwas niedrigeren Gruppe 1+ zuzuordnen.

Zwei Präparate aus okzipitalem Kortex und jeweils ein Präparat aus frontalem Kortex und Hippokampus weisen keinen ChromograninA-positiven Plaue auf.

## 3.2 Vergleichende immunhistologische Untersuchungen von senilen Plaques

### 3.2.1 Immunreaktivität ChromograninA-positiver Plaques bei DAT

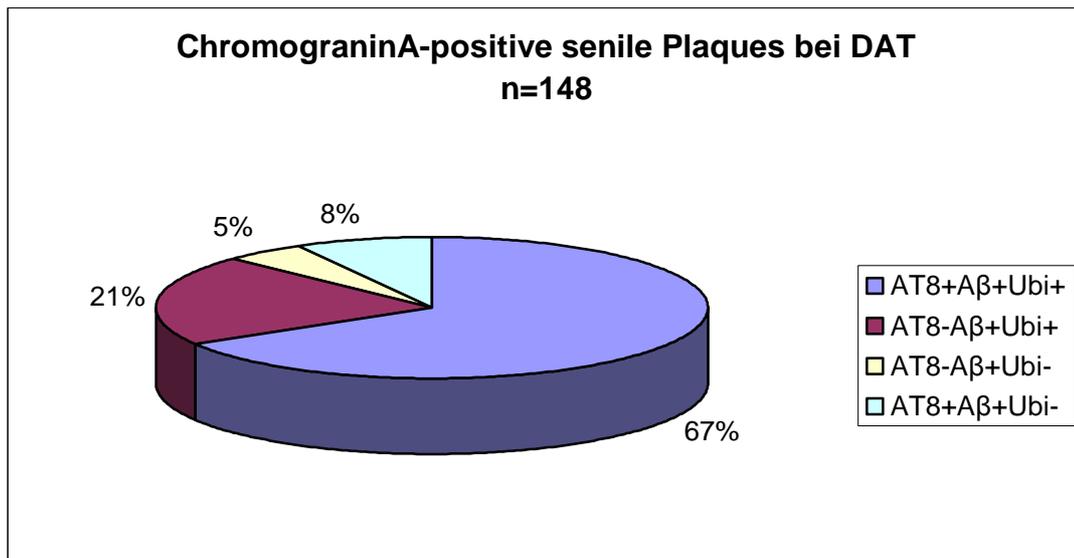


Abbildung 3.11

Ausgehend von einer ChromograninA-Positivität zeigen im Kollektiv des M. Alzheimer, wie Abbildung 3.11 zu entnehmen, 67% der 148 untersuchten Plaques ebenfalls eine AT8- und Ubiquitin-Positivität und bilden somit hier die größte Gruppe. 21% der gefundenen ChromograninA-positiven Plaques sind ebenfalls Ubiquitin-positiv, jedoch AT8-negativ. Der Anteil der Ubiquitin-negativen aber AT8-positiven Plaques beträgt hier 8%, AT8- und Ubiquitin-Negativität konnte in 5% der Fälle gefunden werden. Von sämtlichen gefundenen  $\beta$ -Amyloid- und ChromograninA-positiven Plaques im Kollektiv des M. Alzheimer zeigen sich 88% folglich auch Ubiquitin-positiv, 75% sind auch AT8-positiv.

Die Darstellung ChromograninA-, AT8-, A $\beta$ - und Ubiquitin-positiver Plaques kann dem Anhang in den Abbildungen 5.1a-e, 5.2a-e und 5.3a-e entnommen werden.

	AT8+A $\beta$ +Ubi+	AT8-A $\beta$ +Ubi+	AT8-A $\beta$ +Ubi-	AT8+A $\beta$ +Ubi-
$\beta$ diffus	86 (87%)	21 (68%)	6 (100%)	11 (92%)
$\beta$ klassisch	13 (13%)	6 (19%)	0 (0%)	1 (8%)
$\beta$ dense-core	0 (0%)	4 (13%)	0 (0%)	0 (0%)
$\Sigma$	99 (100%)	31 (100%)	6 (100%)	12 (100%)

Tabelle 3.11

Bei morphologischer Betrachtung der 148 ChromograninA-positiven senilen Plaques im Alzheimer-Kollektiv zeigt sich gemäß Tabelle 3.11 in allen Untergruppen das deutliche Überwiegen der Plaques vom diffusen Typ. So sind 87% der ebenfalls AT8- und Ubiquitin-positiven Plaques diffus, die restlichen 13% bieten eine klassische Konfiguration. Von den AT8-negativen, aber Ubiquitin-positiven senilen Plaques sind 68% diffus, 19% klassisch und 13% dense-core, AT8-/Ubiquitin-negative Plaques sind zu 100% diffus. In der Gruppe der AT8-positiven/ Ubiquitin-negativen senilen Plaques zeigen sich 92% diffus und 8% klassisch. Ein dense-core Plaque wurde hier nicht gesehen.

### 3.2.2 Immunreaktivität ChromograninA-positiver Plaques bei Kontrollfällen

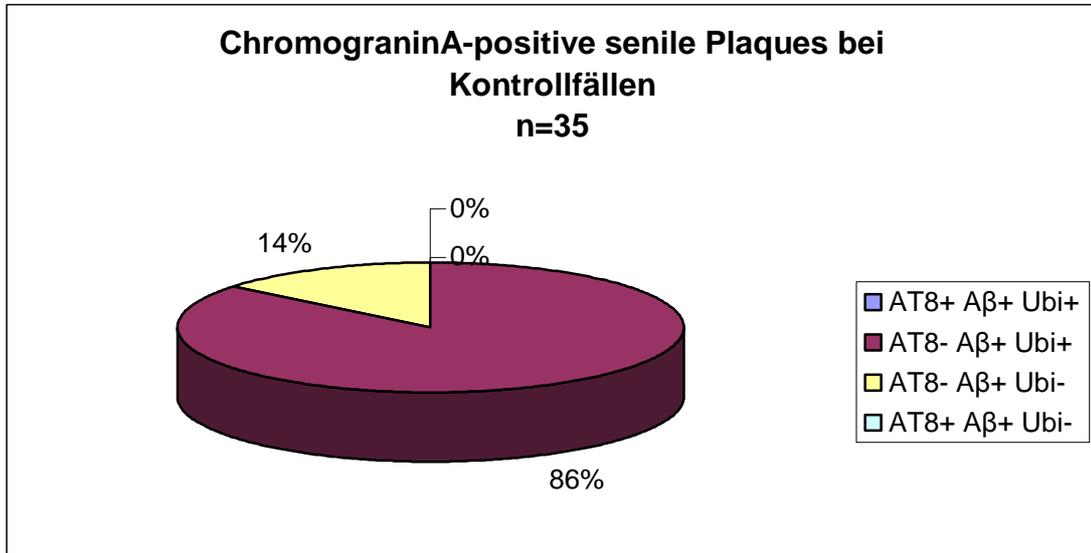


Abbildung 3.12

Die im Kollektiv der nicht-dementen älteren Patienten untersuchten ChromograninA-positiven senilen Plaques bieten im Hinblick auf das Färbeverhalten für die anderen Antikörper ein homogenes Bild: Wie in Abbildung 3.12 dargestellt ist, sind 86% dieser Plaques AT8-negativ/ Ubiquitin-positiv, 14% AT8-/ Ubiquitin-negativ. AT8-positive senile Plaques sind unter den ChromograninA-positiven Plaques in diesem Kollektiv nicht zu finden.

Die Darstellung ChromograninA-, Aβ- und Ubiquitin-positiver/ AT8-negativer Plaques kann dem Anhang in den Abbildungen 5.5a-e und 5.6a-e entnommen werden.

	AT8+ Aβ+ Ubi+	AT8- Aβ+ Ubi+	AT8- Aβ+ Ubi-	AT8+ Aβ+ Ubi-
β diffus	0 (0%)	21 (70%)	4 (80%)	0 (0%)
β klassisch	0 (0%)	9 (30%)	1 (20%)	0 (0%)
β dense-core	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Σ	0	30 (100%)	5 (100%)	0

Tabelle 3.12

In der morphologischen Untersuchung ist, wie in Tabelle 3.12 zu lesen, wiederum die Mehrheit der gefundenen Plaques vom diffusen Typ. Für die Ubiquitin-positiven senilen Plaques trifft dies für 70% zu, 30% sind klassisch konfiguriert. Von den ebenfalls Ubiquitin- negativen senilen Plaques sind 80% diffus und 20% klassisch. Dense-core Plaques können in diesem Kollektiv nicht gefunden werden.

### 3.2.3 Immunreaktivität AT8-positiver Plaques bei DAT

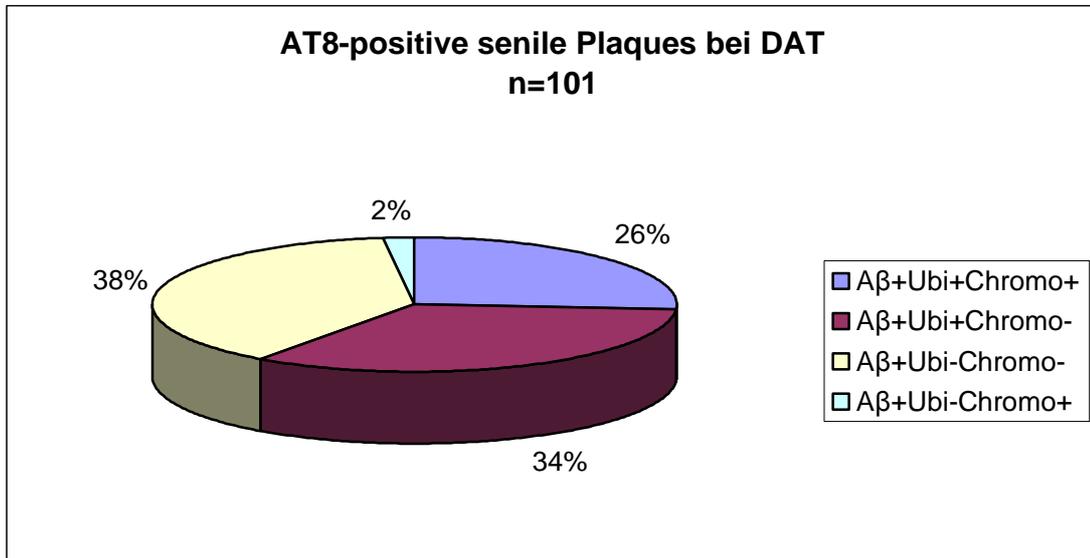


Abbildung 3.13

Wie der Abbildung 3.13 zu entnehmen ist, zeigen sich ausgehend von einer AT8-Positivität von 101 senilen Plaques bei M. Alzheimer 38% Ubiquitin- und ChromograninA-negativ. Am zweithäufigsten ist hier mit 34% der Ubiquitin-positive/ChromograninA-negative Plaque vertreten. 26% der untersuchten Plaques weisen hier sowohl eine positive Reaktion für Ubiquitin wie auch für ChromograninA auf. 2% sind ChromograninA-positiv/ Ubiquitin-negativ. Von 101 untersuchten AT8-positiven senilen Plaques sind hier also, ungeachtet der Ubiquitin-Positivität, insgesamt nur 28% auch ChromograninA-positiv.

Die Darstellung eines AT8- und Aβ-positiven/ Ubiquitin- und ChromograninA-negativen Plaques ist dem Anhang in den Abbildungen 5.4a-e zu entnehmen.

	Aβ+Ubi+Chromo+	Aβ+Ubi+Chromo-	Aβ+Ubi-Chromo-	Aβ+Ubi-Chromo+
β diffus	18 (69%)	31 (91%)	32 (82%)	2 (100%)
β klassisch	8 (31%)	3 (9%)	5 (13%)	0 (0%)
β dense-core	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)
	26 (100%)	34 (100%)	39 (100%)	2 (100%)

Tabelle 3.13

Bei morphologischer Betrachtung zeigt sich, wie in Tabelle 3.13 aufgelistet, wiederum der Großteil seniler Plaques diffus. 69% der Ubiquitin-/ ChromograninA-positiven Plaques sind diffus, 31% klassisch. Bei den Ubiquitin-positiven/ ChromograninA-negativen senilen Plaques lassen sich 91% dem diffusen, 9% dem klassischen Typ zuordnen. Im Falle von Ubiquitin-/ ChromograninA-Negativität erscheinen 82% diffus, 13% klassisch und 5% als dense-core Plaques. In der kleinen Gruppe Ubiquitin-negativer/ ChromograninA-positiver Plaques sind sämtliche diffus.

### 3.2.4 Immunreaktivität AT8-positiver Plaques bei Kontrollfällen

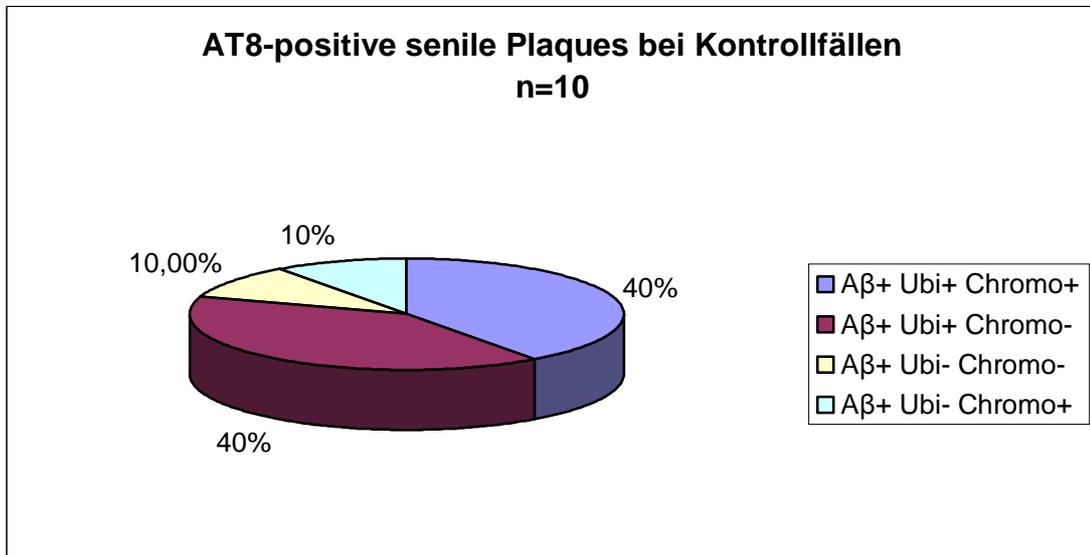


Abbildung 3.14

Bei 10 AT8-positiven senilen Plaques, welche in den Serienschnitten des Kollektivs älterer nicht-dementer Menschen untersucht wurden, kann zur Hälfte eine ChromograninA-Positivität, zur Hälfte eine ChromograninA-Negativität beobachtet werden. Ausgehend davon zeigt Abbildung 3.14, dass jeweils ein Plaque in beiden Gruppen dabei Ubiquitin-negativ, der Rest Ubiquitin-positiv ist.

	Aβ+ Ubi+ Chromo+	Aβ+ Ubi+ Chromo-	Aβ+ Ubi- Chromo-	Aβ+ Ubi- Chromo+
β diffus	4 (100%)	4 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
β klassisch	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
β dense-core	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Σ	4 (100%)	4 (100%)	1 (100%)	1 (100%)

Tabelle 3.14

Tabelle 3.14 ist zu entnehmen, dass sämtliche hier beobachteten Plaques diffus sind. Bei der morphologischen Untersuchung lässt sich weder ein klassischer, noch ein dense-core Plaque finden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Material und Methodendiskussion

#### 4.1.1 Begründung für die Wahl der Antikörper

Neurofibrilläre Tangles und senile Plaques sind, wie bereits in der Einleitung beschrieben, die wichtigsten histopathologischen Befunde bei der neuropathologischen Histodiagnostik einer Demenz vom Alzheimerstyp. Das in den neurofibrillären Tangles vorliegende hyperphosphorylierte Tau-Protein ist jedoch ebenso in den dystrophen Neuriten neuritischer seniler Plaques nachzuweisen [Braak et al. 1991, Dickson 1997, Griffin et al. 1995, Thal et al. 2000].

Zur histologischen Darstellung der Morphologie seniler Plaques gibt es grundsätzlich zwei Methoden: Zum einen die immunhistochemische Darstellung mittels Antiseren für das kumulierte A $\beta$ -Peptid nach Vorbehandlung des Präparates mit Ameisensäure und zum anderen die Silberfärbungen. Unter den Silberfärbungen gibt es wiederum verschiedene Methoden, von denen einige, z.B. die Versilberung nach Campbell-Switzer, besonders sensitiv für Amyloidablagerungen sind. Andere betonen vor allem neurofibrilläre Tangles [Ellison et al. 2004]. Dieses Verfahren zur Darstellung intraneuronaler und extrazellulärer Ablagerungen wird jedoch in der Diagnostik des Morbus Alzheimer eher nicht mehr empfohlen, da hiermit oft die Gesamtzahl an  $\beta$ -Amyloid-positiven Plaques eines Schnittes unterschätzt wird [Ellison et al. 2004, Thal et Braak 2005]. Daher wird die immunhistochemische Darstellung der pathologischen Proteine mit einem gegen das hyperphosphorylierte Tau-Protein gerichteten, so wie einem gegen das  $\beta$ -Amyloid gerichteten Antikörper als zeitgemäße Methode empfohlen.

Daher sind in der vorliegenden Arbeit ein polyklonaler Antikörper gegen Tau-Protein und der monoklonale Antikörper AT8 gegen paired helical filament-Tau-Protein (PHF-Tau-Protein) zur Erfassung der Tau-Pathologie und ein monoklonaler Antikörper gegen  $\beta$ -Amyloid zur Detektion und morphologischen Klassifizierung seniler Plaques gewählt worden. Sowohl der Tau-Antikörper, als auch der AT8-Antikörper stellen Tau Protein dar. Der Unterschied zwischen diesen beiden Antikörpern liegt vor allem in der bevorzugten Bindung des AT8-Antikörpers an das pathologisch hyperphosphorylierte Tau-Protein [Goedert et al. 1995].

Entgegen der Erwartung, dass sämtliche senilen Plaques, die in der AT8-Immunhistologie zu finden sind, auch in der Tau-Immunhistologie positiv erscheinen, zeigte sich in der Versuchsreihe, dass sich nicht alle AT8-positiv markierten, senilen Plaques auch in der Tau-Färbung darstellen. Dieses Phänomen ist zwar, wenn auch mit einem anderen Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau, in der Literatur beschrieben, Ursachen sind allerdings noch unbekannt [Su et al. 1994]. Aus diesem Grund und wegen der geringeren Hintergrundfärbung des AT8-Antikörpers wurde nach Auswertung der Dichte der senilen Plaques für alle einzelnen angewendeten Antikörper ausschließlich die AT8-Immunhistologie bei der immunhistochemischen Charakterisierung der Tau-Protein-positiven neuritischen Komponente der senilen Plaques berücksichtigt.

Eine weitere Charakterisierung seniler Plaques kann durch ihre Immunreaktivität für Ubiquitin erfolgen. Wie bereits oben beschrieben tritt dieses relativ kleine Polypeptid in allen eukaryoten Zellen auf und spielt eine zentrale Rolle im nichtlysosomalen, ATP abhängigen Proteinabbau der Zelle. Somit ist Ubiquitin von großer Bedeutung in der Regulation sämtlicher Prozesse auf Zellebene. Es wird vermutet, dass diesem Ubiquitin-Proteasom-System eine fundamentale Rolle in dem Prozess der Neurodegeneration zukommt [Dimakopoulos 2005]. Immunhistologische Untersuchungen beschreiben das Vorkommen von intrazellulären, filamentösen, ubiquitinierten Einschlüssen bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. dem Morbus Alzheimer. Es gibt Hinweise in der Literatur auf das Vorhandensein bestimmter Plaques mit abweichender Immunreaktivität, in deren immunhistologischer Charakterisierung Ubiquitin eine Rolle spielt [Ellison et al. 2004].

Das Protein-Prohormon ChromograninA kommt, neben anderen Verwandten der Graninfamilie wie ChromograninB und auch Sekretoneurin II, in sekretorischen Granula, nicht nur im Gehirn, sondern in den meisten Zellen neuroendokriner Organe vor. Es konnte gezeigt werden, dass Chromogranine in bestimmten Gehirnarealen durch neuronale Aktivität und neurotrophe Faktoren gesteuert werden [Huang et al. 2001, Shen et Gundlach 1996]. Gemäß ihrer Eigenschaft, mit hoher Kapazität aber geringer Affinität zu binden, scheinen sie an der Kondensation und Aggregation großer ‚dense core vesicles‘ beteiligt zu sein [Kim et al. 2001, 2003]. Ihre Zusammenlagerung wird von Calciumionen und einem niedrigen pH-Wert unterstützt – beides Eigenschaften des Trans-Golgi Netzwerkes [Kromer et al. 1998]. ChromograninA ist ein Substrat der Acetylcholinesterase, die wegen des erheblichen Acetylcholinmangels beim M. Alzheimer mit der Pathogenese der DAT in Verbindung

gebracht wird [Small et al. 1986, Tago et al. 1987]. Daneben konnte ChromograninA in neuritischen Plaques nachgewiesen werden [Marksteiner et al. 2002, Wang et Munoz 1995]. Es scheint sowohl in senilen Plaques der Alzheimererkrankung, als auch in den Plaques von Gehirnen klinisch unauffällig gealterter Menschen eine Rolle zu spielen [Ellison 2004].

#### **4.1.2 Begründung für die Wahl des Auswertungsverfahrens**

Es stand zur Diskussion, die Präparate semiquantitativ, nach der dichtesten Region innerhalb eines Gehirnschnittes, nach der Dichte an bestimmten definierten Lokalisationen innerhalb eines Präparates oder nach der Dichte in der grauen Substanz des gesamten Präparates zu unterscheiden. Bei der Erprobung aller drei Varianten mittels dreier Probefälle hat sich im Rahmen dieser Arbeit letztere Methode als diejenige mit der größten Aussagekraft erwiesen.

Bei der Einteilung anhand des dichtesten Plaquevorkommens sind nämlich Schnitte mit mäßig vielen verstreut liegenden Plaques im Vergleich mit Schnitten, die insgesamt weniger, jedoch nicht so stark verstreut gelegenen Plaques vorzuweisen hatten, in ihrer Gesamtdichte oft zu niedrig eingestuft worden.

Ähnliche Probleme gab es bei der Auswertung einer definierten Lokalisation: Wiesen die Schnitte an dieser Stelle wenige, aber ansonsten recht viele Plaquestrukturen auf, vielen die Ergebnisse ebenfalls zu niedrig aus.

## **4.2 Interpretation der Ergebnisse**

Die Demenz vom Alzheimerstyp gehört zu den neuropathologisch am besten erforschten Demenzen. Seit ihrer Entdeckung 1907 sind viele neue Erkenntnisse gewonnen worden. Wie in der Einleitung bereits ausführlich erläutert, sind die neurohistologischen Hauptmerkmale der DAT die Ablagerung von hyperphosphoryliertem Tau-Protein in Form neurofibrillärer Tangles (aber auch als Neuropilfäden und neuritische Plaquekomponenten) und die extrazelluläre Anreicherung von  $\beta$ -Amyloid in so genannten senilen Plaques. In dieser Arbeit wird insbesondere ein Fokus auf die Immunreaktivität dieser senilen Plaques mit Hilfe der Antikörper gegen Tau, AT8,  $\beta$ -Amyloid, Ubiquitin und ChromograninA gelegt.

$\beta$ -Amyloid stellt die extrazelluläre Hauptkomponente der senilen Plaques dar. Daneben können senile Plaques aber auch durch Markierung neuritischer

Plaquekomponenten eine AT8-Immunreaktivität aufweisen [Ellison et al. 2004, Thal et Braak 2005, Yashura et al. 1994a]. Diese neuritischen Plaquekomponenten scheinen einen Großteil der in DAT Gehirnen nachgewiesenen senilen Plaques zu charakterisieren. Weiter ist beschrieben, dass ChromograninA und Ubiquitin ebenfalls immunhistologisch in senilen Plaques nachweisbar sein können. Als ‚neuritische Besonderheit‘ ist in DAT Gehirnen eine Untergruppe von Plaques beschrieben worden, die zwar  $\beta$ -Amyloid- und Ubiquitin-Positivität aufweisen, allerdings kein pathologisch verändertes Tauprotein beinhalten und darüber hinaus positiv mit Antikörpern gegen ChromograninA reagieren [Ellison et al. 2004, Wang et Munoz 1995]. Es scheint Hinweise darauf zu geben, dass es sich dabei um eine Plaquekonfiguration handelt, die vor allem in Gehirnen physiologisch gealterter Menschen eine Rolle spielt [Ellison et al. 2004, Yashura et al. 1994b].

Senile Plaques, wenn auch in geringerer Zahl, werden in neuropathologischen Studien an Gehirnen alter Menschen ohne Demenz fast regelhaft gefunden. Diese Plaques sind vor allem in neokortikalen Bereichen nachzuweisen; sie lassen sich in der  $\beta$ -Amyloid- Immunhistochemie darstellen und werden mehrheitlich dem diffusen Typ der senilen Plaques zugeordnet [Mackenzie 1994, Morris et al. 1996, Price et al. 1991]. Sämtlicher hier erwähnter Literatur ist die Frage gemeinsam, ob es sich bei diesen Plaques um normale Alterserscheinungen handelt, oder ob sie eine Vorstufe des Morbus Alzheimer im Sinne einer ‚präklinischen AD‘ darstellen [Chong et Sahadevan 2005].

Die morphologische Einteilung seniler Plaques beinhaltet trotz ihrer großen Heterogenität, wie bereits in der Einleitung erläutert, eine Unterscheidung in diffuse, klassische und dense-core Plaques. Daneben findet noch der Begriff des ‚neuritischen Plaques‘ Verwendung: Er impliziert das Vorhandensein eines Randwalles aus dystrophen Neuriten, der den Plaque umgibt. Einige Autoren vermuten einen Progress von diffusen zu klassisch konfigurierten Plaques mit dem ‚dense-core‘ oder ‚burnt-out‘ Plaque als vorläufiges Endstadium [Davies et Mann 1993, Terry et Wisniewski 1970, 1972].

Setzt man voraus, dass tatsächlich ein Progress verschiedener morphologischer Plaqueformen stattfindet und dass in Gehirnen physiologisch alternder Menschen tatsächlich der Ubiquitin- und ChromograninA-positive, aber Tau-negative, senile Plaque dominiert, liegt die Frage nach grundsätzlichen Unterschieden zwischen Plaques von normal Gealterten und Alzheimerkranken nahe.

Um diese Zusammenhänge besser zu beleuchten, sind in der vorliegenden Studie Gehirne von 41 DAT Patienten und 10 physiologisch gealterten nicht-dementen alten Menschen immunhistochemisch untersucht worden.

Als Basis für die genauere Auswertung der Charakteristika einzelner immunhistochemisch unterschiedlich markierter seniler Plaques wurde zunächst die quantitative Ausprägung der senilen Plaques in den einzelnen Fällen untersucht. Dabei wurde die Dichte der senilen Plaques in den einzelnen immunhistochemischen Versuchsreihen in Bezug auf die Gesamtfläche der grauen Substanz abgeschätzt und in ihrer jeweiligen Lokalisation frontal, hippokampal oder okzipital dokumentiert.

Die Dichte der senilen Plaques in der  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie lag bei den meisten ausgewerteten Präparaten des Alzheimerkollektivs im Bereich 3+ für hippokampale und okzipitale Schnitte, frontal waren sogar 18 von 37 Schnitten im Bereich 4+ anzusiedeln. Für die anderen verwendeten Antikörper lagen die Werte für die Dichte markierter seniler Plaques meist in der Gruppe 2+. In der zehnten Fälle umfassenden Gruppe nicht-dementer älterer Menschen konzentrierten sich die in der  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie detektierten senilen Plaques ebenfalls in der Gruppe 3+, allerdings lagen nur zwei Präparate über dieser Marke. Senile Plaques konnten also nicht nur in Alzheimergehirnen, sondern auch in den Gehirnen der gesunden Vergleichsgruppe nachgewiesen werden. Die in der Literatur beschriebene geringere Dichte seniler Plaques in den Gehirnen physiologisch Gealterter war ebenfalls feststellbar, wobei Unterschiede bezüglich der Lokalisation der senilen Plaques sich durch die vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig belegen lassen.

Im nächsten Schritt stand die Beurteilung der Tau-Pathologie im Vordergrund: Der Antikörper AT8 richtet sich gegen PHF-Tau, also hyperphosphoryliertes Tau-Protein [Goedert et al. 1995], und macht somit eine Aggregation von abnorm phosphoryliertem Tau-Protein immunhistologisch sichtbar. Eine derartige Aggregation findet sich nicht nur bei den intraneuronalen neurofibrillären Tangles, sondern auch in dystrophen Neuriten neuritischer Plaques sowie auch in so genannten Neuropilfäden [Thal et Braak 2005]. Neuritische Plaques können also sowohl in der  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie als auch der AT8-Immunhistologie sichtbar gemacht werden, wobei hier jeweils eine unterschiedliche Komponente markiert wird.

Im Vergleich zu dem verwendeten polyklonalen Antikörper gegen Tau-Protein zeigte der AT8-Antikörper in dieser immunhistologischen Untersuchung eine größere Zahl angefärbter seniler Plaques. So wurden hier insgesamt 45 Präparate mit 3+ und

mehr eingestuft, in der Tau-Immunhistologie waren es nur 25 Schnitte. In der immunhistochemischen Charakterisierung einzelner Plaques, die sich der allgemeinen Bestimmung der Dichte der senilen Plaques anschließt, wurden die Ergebnisse der AT8-Immunhistologie für die Bewertung der Tau-Pathologie herangezogen. In der Vergleichsgruppe ließ sich von je zehn frontalen, okzipitalen und hippokampalen Schnitten in nur insgesamt sechs Schnitten eine AT8-Positivität im Bereich von 1+ erkennen, AT8-Antikörper detektierten darüber hinaus noch in vier Präparaten dieser Gruppe eine Plaquedichte von 2+, alle anderen Schnitte der Vergleichsgruppe waren AT8-negativ.

Hinsichtlich einer in senilen Plaques nachzuweisenden Tau- Pathologie zeigten sich also hier im Vergleich zur  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie größere Unterschiede: So waren im Kollektiv älterer Menschen ohne Demenz kaum AT8-positive Plaques feststellbar, in der Frontalregion sogar gar keine. In den Gehirnen an M. Alzheimer Erkrankter waren im Vergleich dazu nur drei von 36 frontalen, einer von 41 hippokampalen und vier von 30 okzipitalen Schnitten ohne jegliche AT8-Positivität. Klinisch-pathologische Studien haben ergeben, dass frühe oder ‚präklinische‘ Stadien der DAT unter anderem durch  $\beta$ -Amyloid-positive Plaques in neokortikalen Regionen gekennzeichnet sind, aber nicht durch Tau-immunreaktive Pathologie [Morris et al. 1996]. In diesem Kontext ist nicht auszuschließen, dass die vorhandene A $\beta$ -Pathologie bei fehlendem oder nur geringem Nachweis veränderten Tau-Proteins ein möglicher Hinweis für ein ‚präklinisches‘ Stadium der Alzheimererkrankung sein könnte. Die erhöhte Dichte taupathologischer Plaques in den Gehirnen des Alzheimerkollektivs bestätigt das bereits vorbeschriebene gehäufte Vorkommen von Plaques mit neuritischer Komponente bei dieser Krankheit [Ellison et al. 2004, Thal et Braak 2005, Yashura et al. 1994b].

Der Bestimmung der Dichte seniler Plaques mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Amyloid und gegen hyperphosphoryliertes Tau-Protein folgt die Auswertung der ChromograninA-Positivität: Es gibt Hinweise, dass ChromograninA Peptide in Gehirnen Alzheimererkrankter erhöht sind [Brion et al. 1991, Lassmann et al. 1992, Wang et Munoz 1995, Yasuhara et al. 1994a]. Vor allem scheint man dieses Peptid in den dystrophen Neuriten zu finden [Munoz 1991]. ChromograninA ließ sich in einem großen Teil der Präparate des Alzheimerkollektivs in senilen Plaques nachweisen: Frontal waren nur vier von 36 Schnitten negativ, hippokampal sechs von 41 und okzipital drei von 30. Bei insgesamt 94 von 107 ausgewerteten DAT-Präparaten ließ sich ChromograninA nachweisen, davon betrug bei 80 Präparaten die Dichte der

markierten Plaques 2+ und mehr. In den Vergleichsfällen nicht-dementer älterer Menschen verhielt es sich ähnlich: Hier konnte meistens frontal und okzipital die Dichte der ChromograninA-positiven Plaques mit 2+ beschrieben werden, in der Mehrheit der okzipitalen Präparate zeigte sich eine Dichte von 1+, nur vier von 30 Präparaten zeigten keine Immunpositivität für ChromograninA.

In der Literatur wird beschrieben, dass bei der Alzheimer Erkrankung 30% der  $\beta$ -Amyloid-positiven Plaques auch ChromograninA-positiv sind, wobei die größte relative Anzahl an ChromograninA-immunopositiven Plaques im dorsolateralen Cortex anzutreffen ist [Lechner et al. 2004]. Über den Anteil ChromograninA-positiver Plaques an der Gesamtzahl der durch die A $\beta$ -Immunohistologie detektierten Plaques kann durch die hier vorgenommenen Untersuchungen keine genaue Aussage gemacht werden. Der Vergleich der jeweiligen Dichte der  $\beta$ -Amyloid-positiven senilen Plaques und der ChromograninA-positiven senilen Plaques scheint aber durchaus für einen solchen Befund zu sprechen. Des Weiteren kann man der Auswertung entnehmen, dass im Kollektiv der Patienten mit DAT die Dichte der ChromograninA-Plaques in den hier gewählten drei Gehirnregionen im Wesentlichen gleich ist und sich keine eindeutig bevorzugte Region zeigte. Im Vergleichskollektiv scheint die ChromograninA-Dichte frontal und okzipital am höchsten zu sein, in hippokampalen Regionen zeigte sie sich etwas geringer. Das in der Literatur erwähnte vermehrte Auftreten seniler Plaques in neokortikalen Regionen nicht-dementer älterer Patientengehirne scheint sich in diesem Fall in der ChromograninA-Immunhistologie zu bestätigen [Schmitt et al. 2000].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die semiquantitative Auswertung der Dichte der senilen Plaques mit Hilfe verschiedener Antikörper tendenziell bestätigt, was andere, in der Literatur beschriebene Studien ebenfalls postulieren:  $\beta$ -Amyloid-positiv senile Plaques sind sowohl in den Gehirnen Alzheimererkrankter, als auch in den Gehirnen nicht-dementer älterer Menschen zu finden; allerdings bei letzteren in geringerer Zahl. Im Vergleich dazu lässt sich durch die vorliegenden Ergebnisse eine Taupathologie der Plaques nur für die Demenz vom Alzheimer Typ bestätigen, scheint das Vorhandensein AT8-positiver Plaques in den Gehirnen der Vergleichsgruppe nur extrem selten zu sein. ChromograninA-immunreaktive senile Plaques sind in beiden Kollektiven nachzuweisen, die beobachteten Häufigkeiten liegen jedoch, wie zu erwarten, unter denen der A $\beta$ -positiven Plaques, im Vergleichskollektiv sind hier vorwiegend neokortikale Strukturen betroffen.

Hier stellt sich nun die Frage, wie die ChromograninA- Immunreaktivität der senilen Plaques bei DAT im Detail aussieht und ob es Unterschiede zu den Befunden in den Gehirnen der nicht-dementen älteren Menschen gibt.

Zur Untersuchung dieser Fragen wurde in einem zweiten Schritt eine genauere Untersuchung des immunhistologischen Markierungsmusters der ChromograninA-immunreaktiven senilen Plaques mit den übrigen Antikörpern vorgenommen. Dazu wurden solche Chromogranin A- positive senile Plaques aufgesucht und markiert, die in Umgebung prominenter morphologischer ‚Landmarken‘ liegen, um auf den korrespondierenden Serienschnitten die Immunreaktivität derselben Plaques mit anderen Antikörpern hinreichend sicher beurteilen zu können. In der A $\beta$ -Immunhistologie wurde dann zusätzlich eine morphologische Einteilung dieser senilen Plaques vorgenommen. Auf diese Weise wurden in insgesamt 107 zur Verfügung stehenden Präparaten von 41 Alzheimerfällen, die sich in 36 frontale, 41 hippokampale und 30 okzipitale Schnitte aufteilen, 148 ChromograninA-positive Plaques untersucht. Im Vergleichskollektiv wurden in 30 Schnitte mit der Verteilung von je zehn auf frontale, hippokampale und okzipitale Regionen 35 ChromograninA-haltige Plaques beobachtet.

In den Gehirnen von Patienten mit M. Alzheimer waren unter den beobachteten Chromogranin A-immunreaktiven senilen Plaques mit 67% die sowohl AT8- als auch Ubiquitin-positiven Plaques am weitaus häufigsten vertreten. 21% der Plaques waren positiv für Ubiquitin, aber negativ für AT8, 8% der Plaques zeigten sich AT8-positiv, jedoch Ubiquitin-negativ und die kleinste Gruppe wurde mit 5% von den Ubiquitin- und AT8-negativen Plaques gebildet. Insgesamt wiesen bei diesem Serienschnittvergleich ChromograninA-positive senile Plaques zu 75% eine AT8-Immunreaktivität und zu 88% eine Ubiquitin-Positivität auf. Die genauere morphologische Betrachtung der am häufigsten vorhandenen Ubiquitin- und AT8-positiven Plaques ergab 87% diffuse Plaques, 13 % zeigten sich als klassisch. Unter den Ubiquitin-positiven, aber AT8-negativen bildeten ebenfalls die Diffusen die größte Gruppe mit 68%. Die übrigen waren mit 19% klassischen und 13% dense-core Plaques relativ gleichmäßig verteilt.

ChromograninA-positive Plaques der Vergleichsgruppe zeigten sich nie AT8-positiv. Die detektierten Plaques verteilten sich auf zwei Gruppen: Die untersuchten senilen Plaques waren in 86% Ubiquitin-positiv und AT8-negativ, in 14% Ubiquitin- und AT8-negativ. Dieser Serienschnittvergleich zeigte also bei ChromograninA-

positiven senilen Plaques in der Kontrollgruppe zu 100% eine AT8-Negativität, aber in 86% eine Ubiquitin-Positivität. Insgesamt waren hier 25 von 35 Plaques morphologisch diffus und zehn von 35 klassisch.

Das in der Literatur beschriebene vermehrte Auftreten ChromograninA- und Ubiquitin-positiver und dabei AT8-negativer Plaques in den Gehirnen nicht-dementer älterer Menschen [Ellison et al. 2004, Wang et Munoz 1995] bestätigte sich hier. Weiter scheint eine ChromograninA- Positivität fast immer mit einer Ubiquitin-Positivität kombiniert zu sein. In einer entsprechenden Untersuchung wurde näher beschrieben, dass es zwei vorherrschende Plaquetypen gibt, die in Gehirnen von Alzheimerpatienten und normal Gealterten immunhistochemisch zu differenzieren sind: Typ I zeigt positive Reaktionen für Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau, das A $\beta$ -Peptid, Ubiquitin. Typ II ist immunopositiv für Antikörper gegen ChromograninA, das A $\beta$ -Peptid und Ubiquitin, aber nicht für hyperphosphoryliertes Tau. In Alzheimergehirnen, so die Autoren, sei eine Mischung beider Typen zu finden, in den Gehirnen physiologisch gealterter Menschen mit Plaques scheinen Typ II Plaques zu dominieren [Wang et Munoz 1995, Yasuhara et al. 1994b]. Letzteres, die Gehirne normal gealterter Menschen betreffend, wird auch durch das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung widerspiegelt. Was sich bei der Bestimmung der Plaquedichte durch die nahezu verschwindend geringe Häufigkeit AT8-positiver Plaques in den Gehirnen der Vergleichsgruppe angedeutet hat, wird durch die Befunde an ChromograninA-positiven senilen Plaques bestätigt: Mit einem Anteil von 86% kann die Gruppe Ubiquitin-positiver/ AT8-negativer Plaques im Vergleichskollektiv als prädominant angesehen werden. Aber auch hier sei darauf hingewiesen, dass wiederum der Anteil ChromograninA-haltiger Plaques am gesamten Plaquevorkommen in der vorliegenden Arbeit nur über einen Vergleich der Plaquedichten von A $\beta$ - und Chromograninimmunhistochemie abgeschätzt werden kann. In der Kontrollgruppe zeigte sich hier im Hinblick auf die Dichte A $\beta$ -positiver seniler Plaques die Betonung der Gruppe 2+/3+, im Vergleich dazu war die Dichte ChromograninA-positiver Plaques vor allem knapp darunter im Bereich von 1+/2+ anzusiedeln.

Aus den verschiedenen immunhistologischen Markierungsmuster der senilen Plaques und ihrem Vorkommen in DAT-Gehirnen sowie in Gehirnen nicht-dementer älterer Menschen könnte gefolgert werden, dass die senilen Plaques mit dystrophen Neuriten vom Typ II als ‚benigne‘ anzusehen sind und sie unabhängig von neurofibrillärer Pathologie auftreten [Yasuhara et al. 1994b]. In diesem Sinne scheint

es sinnvoll, die Ergebnisse der Untersuchung ChromograninA- positiver Plaques in NDEP-Gehirnen mit dem immunhistochemischen Markierungsmuster ChromograninA-positiver Plaques in DAT-Gehirnen zu vergleichen: Anders als in den Gehirnen der Vergleichsgruppe dominieren hier die Plaques, die neben ChromograninA auch Ubiquitin- und AT8-immunreaktiv sind. Das in Schnitten der Vergleichsgruppe am häufigsten vertretene Markierungsmuster der Ubiquitin-positiven, aber für AT8-negativen Plaques stellt im DAT-Kollektiv nur die am zweithäufigsten vertretene Gruppe dar. Es besteht augenscheinlich ein Unterschied bezüglich der Immunreaktivität ChromograninA-positiver Plaques für hyperphosphoryliertes Tau-Protein in den beiden Gruppen. Andere Untersuchungen an Gehirnen mit geringer Last an senilen Plaques und ohne neurofibrilläre Tangles haben gezeigt, dass frühe Stadien dystropher Neuriten nicht immer Veränderungen des Tau-Proteins aufweisen [Vickers et al. 1996]. Weitere Studien haben vermutet, dass eine signifikante Tau-Pathologie erst ein relativ später Vorgang in der Entstehung dystropher Neuriten sei [Su et al. 1996]. Thal et al. vermuteten, dass eine Akkumulation von Amyloid-Precursor-Protein in den Neuriten die Konsequenz einer Veränderung des axonalen Transportes ist, der eng an die Tau-Pathologie geknüpft ist [Thal et al. 1998].

Es zeigen sich also zwei Interpretationsansätze: Zum einen könnte die oben beschriebene AT8-Negativität ChromograninA-positiver seniler Plaques als Ausdruck einer ‚benignen Form‘ der Plauepathologie gesehen werden [Yasuhara et al. 1994a]. Ihr Auftreten wäre demnach mit dem physiologischen Altern vereinbar und eine spätere Entwicklung der Alzheimersymptomatik nicht unbedingt obligat. Dies bedeutet aber auch, dass beide hier hervorgehobenen Plaquetypen bei der Alzheimererkrankung, wie auch in der vorliegenden Untersuchung gezeigt, grundsätzlich nebeneinander bestehen können. Sie würden verschiedene, von einander relativ unabhängige Entwicklungsstufen durchlaufen und nur einer von beiden könnte mit dem klinischen Auftreten der Erkrankung in Verbindung gebracht werden.

Zum anderen könnte der ChromograninA- / Ubiquitin-positive und AT8-negative Plaque aber auch eine ‚präklinische Stufe‘ des M. Alzheimers beschreiben, bei der die Alzheimersymptomatik mit fortschreitendem Alter zwangsläufig ist und ein Progress der Erkrankung mit zunehmender Taupathologie auftritt. In diesem Falle könnte ein diffuser, A $\beta$ - , Ubiquitin- , ChromograninA-positiver und noch AT8-negativer Plaque im Laufe seiner pathologischen Entwicklung durch fortschreitende

Degeneration der Neuriten AT8-Positivität erlangen und eventuell auch zunehmende intellektuelle Einbußen verursachen.

Welche Rolle spielt aber ChromograninA bei diesen Überlegungen und gibt es unter Umständen auch eine Veränderung der ChromograninA-Positivität desselben Plaques im Verlauf seiner Entwicklung?

Es wird vermutet, dass dystrophe Neuriten altern. Synaptische Marker, wie z.B. das Chromogranin, könnten weitere Gruppen von Axonen zeigen, die sich einer reaktiven Synaptogenese unterziehen, und somit Ausdruck einer reaktiven Synaptogenese sein. Darüber hinaus zeigt die Immunreaktivität der Neurofibrillen in frühen dystrophen Neuriten große Gemeinsamkeit mit den Modellen für physikalische Schädigungen des Gehirns. Man kann vermuten, dass  $\beta$ -Amyloid-Plaques im Sinne eines physikalischen Traumas auf die umgebenden Axone wirken und dass dadurch neurofibrilläre und synaptische Veränderungen auftreten, die Verbunden sind mit einer chronischen Stimulation als stereotype Antwort auf diese Art von Schädigung [Dickson et al. 1999]. Dies könnte als Ursache der reaktiven Synaptogenese angeführt werden. Neuere Studien greifen das auf und zeigen genauer, dass rezeptorvermittelte Aktivierung so genannter ‚Advanced Glycation Endproducts‘ als ein Induktor sämtlicher Peptide der Chromograninfamilie fungiert [Huttunen et al. 2002]. Dies scheint mittels akkumulierender A $\beta$ -Fibrillen zu geschehen und könnte somit die ChromograninA-Expression hochregulieren, deren Sekretion im Gegenzug Mikroglia aktiviert und eine nachhaltige Entzündungsreaktion etabliert [Lechner et al. 2004]. Wang und Munoz stellten ein eher hierarchisch orientiertes Modell auf, bei dem A $\beta$ -Ablagerungen keine Tau-positive Neuriten beinhalten, solange sie noch keine synaptischen Proteine, wie z.B. ChromograninA, aufweisen [Wang et Munoz 1995].

Es wird beschrieben, dass Neuriten, die ChromograninA-positiv sind im Vergleich zur Immunreaktivität mit anderen neuronalen Markern, wie z. B. Parvalbumin und Calbindin, bevorzugt Teil neuritischer Plaques zu werden scheinen [Adams et Munoz 1993]. Somit müsste ein großer Teil der AT8-positiven neuritischen Plaques auch ChromograninA-positiv sein, vorausgesetzt ChromograninA persistiert im weiteren ‚Alterungsprozess‘ der Plaqueentwicklung. Dem entgegengesetzt scheint das in der Literatur zu findende seltene Vorkommen einer gemeinsamen Tau- und ChromograninA-Positivität [Joachim et al. 1991].

Zur weiteren Beschreibung der senilen Plaques erfolgte in einem letzten Schritt die Untersuchung des immunhistologischen Markierungsmusters AT8-positiver seniler Plaques. Bezüglich des Auffindens und Markierens „Landmark-naher“ AT8-positiver seniler Plaques wurde wie bei den Untersuchungen der ChromograninA-positiven senilen Plaques verfahren; auch hier wurden die Ergebnisse beim DAT-Kollektiv mit denen des Kollektivs nicht-dementer älterer Menschen verglichen. Im DAT-Kollektiv zeigten sich 26 von 101 gefundenen AT8-positiven Plaques für Ubiquitin- und Chromogranin-positiv. 18 Plaques davon waren diffus und acht klassisch. Die größte Gruppe jedoch wird hier von den ChromograninA-negativen senilen Plaques gebildet: 73 von 101 AT8-positiven Plaques waren ChromograninA-negativ, davon reagierten 39 zusätzlich auch nicht mit dem Antikörper gegen Ubiquitin. Auch in diesen beiden Gruppen sind über 75% der Plaques morphologisch diffus. Nur zwei aller gefundenen AT8-positiven Plaques sind Ubiquitin-negativ und Chromogranin-positiv. In der Vergleichsgruppe zeigte sich bei zehn ausgewerteten Plaques ein relativ ausgeglichenes Bild: fünf von zehn Plaques sind ChromograninA-positiv, einer davon mit negativer Reaktion für Ubiquitin. Die anderen fünf sind Chromogranin-negativ und hiervon ist ebenfalls einer Ubiquitin-negativ. Alle Plaques sind morphologisch als diffus eingestuft worden.

Bemerkenswert scheint, dass sich hier die Mehrzahl der AT8-positiven Plaques negativ für ChromograninA zeigt. Dies ist in der Literatur bereits vorgeschrieben [Joachim et al. 1991]. Geht man von einer Persistenz der ChromograninA-Positivität aus, so würde man eigentlich eine größere Gruppe von sowohl AT8- als auch Chromogranin A-positiven senilen Plaques erwarten. Das relativ seltene Vorkommen ChromograninA-positiver Plaques in dieser Gruppe der AT8-positiven senilen Plaques wirft die Frage auf, ob Plaques im Laufe ihrer Entwicklung eine zuvor bestehende ChromograninA-Positivität im Sinne eines sequentiellen Verlaufs verlieren könnten.

In dem hier untersuchten Kollektiv scheint die morphologische Klassifikation der senilen Plaques keine eindeutigen Schlüsse auf die Immunreaktivität mit den verschiedenen Antikörpern zuzulassen: So waren bei sämtlichen immunhistochemischen Markierungsmustern die diffusen weitaus in der Mehrheit.

In der Literatur gibt es Studien, die zeigen, dass ChromograninA in praktisch allen dystrophen Neuriten morphologisch klassischer Plaques und zusätzlich in einer Subpopulation bestimmter ‚preamyloid plaques‘ erscheinen [Munoz 1991, Wang et Munoz 1995]. Bei Betrachtung der Gruppe klassischer Plaques fällt auf, dass bei den

AT8-positiven Plaques der DAT-Gruppe acht der 26 Ubiquitin- und ChromograninA-positiven Plaques morphologisch als „klassisch“ zu klassifizieren waren. Bei den ChromograninA-negativen Plaques war der Anteil der klassischen Plaques mit acht von 73 geringer. Dies kann die Aussage, dass ChromograninA in ‚praktisch allen dystrophen Neuriten klassischer Plaques vorkommt‘ nur schwer belegen, widerspricht ihr allerdings auch nicht. Mit einem späteren Verlust der ChromograninA-Positivität nur schlecht vereinbar sind weitere Befunde zur morphologischen Plaqueklassifikation: So passt zwar die geringe Zahl von klassischen und dense-core Plaques in der Gruppe ChromograninA-negativer Plaques (8 klassische und 2 dense-core Plaques von 73 ChromograninA-negativen Plaques) zu einem möglichen ChromograninA-Verlust, allerdings finden sich unter 148 ChromograninA-positiven senilen Plaques immerhin auch 20 klassische und 4 dense-core Plaques.

Die Frage nach einem möglichen Verlust der ChromograninA-Positivität im Laufe der Plaqueentwicklung kann hier nicht klar beantwortet werden. Die große Häufigkeit ChromograninA-positiver seniler Plaques in den wahrscheinlich frühen Plaquestadien der diffusen Plaques ist aber unbestritten. Allerdings scheinen ChromograninA-positiv senile Plaques auch oft eine fortgeschrittene Neuritendegeneration zeigen zu können, wie die große Zahl (75%) AT8-positiver Plaques in dieser Gruppe nahe legt. Als Marker dystropher Neuriten ist ChromograninA in neuritischen Plaques bereits beschrieben worden, also einer Plaqueform, die weiter fortgeschritten zu sein scheint [Davies et Mann 1993, Munoz 1991]. Betrachtet man nun die ChromograninA-Befunde auch bei den wahrscheinlich späteren Plaquestadien der klassischen und dense-core Plaques, so wird das Gesamtbild sehr inhomogen und es sind keine definitiven Aussagen möglich. In diesem Sinne kann weder eine Persistenz, noch ein Verlust der ChromograninA-Positivität im Verlaufe der Entwicklung der senilen Plaques eindeutig bewiesen werden. Es scheint jedoch möglich, dass morphologisch späte Plaquestadien sowohl ChromograninA-positiv, als auch ChromograninA-negativ sein können. Systematische Studien, die von unterschiedlichen morphologischen Plaqueformen (und nicht von bestimmten immunhistologischen Befunden) ausgehen und diese auf ihr immunhistochemisches Markierungsmuster hin untersuchen, könnten hier weiterführende Erkenntnisse bringen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse bestätigen also, wie natürlich zu erwarten, ein erhöhtes Vorkommen seniler Plaques in Gehirnen von an Alzheimer erkrankter Patienten im Vergleich zu einem Kollektiv nicht-dementer Menschen, ähnlich verhält es sich mit der Dichte ChromograninA-positiver Plaques. Eine immunhistochemisch nachweisbare Tau-Protein-Pathologie in senilen Plaques war nahezu ausschließlich in den Gehirnen des DAT-Kollektivs zu finden.

Das in der Literatur beschriebene [Ellison et al. 2004, Yashura et al. 1994b] vermehrte Auftreten Chromogranin- / Ubiquitin-positiver aber AT8-negativer Plaques in den Gehirnen älterer Menschen, die nicht an M. Alzheimer erkrankt waren, konnte ebenfalls bestätigt werden.

In den Gehirnen der Kontrollgruppe waren die  $\beta$ -Protein-immunreaktiven senilen Plaques auch häufig ChromograninA-positiv, während eine AT8-Immunreaktivität der senilen Plaques hier allenfalls nur selten vorlag. Die in diesem Kollektiv äußerst seltenen AT8-positiven senilen Plaques waren auch zur Hälfte ChromograninA-negativ (aber zu 90% Ubiquitin-positiv). Im Falle der DAT-Gehirne zeigten sich dagegen AT8-positive senile Plaques häufiger als ChromograninA-positive senile Plaques. Während dreiviertel der ChromograninA-positiven senilen Plaques hier AT8-positiv waren, zeigten sich umgekehrt AT8-positive senile Plaques bei der Alzheimerdemenz in fast dreiviertel der Fälle ChromograninA-negativ.

ChromograninA- positive senile Plaques waren sowohl bei der DAT als auch in der Kontrollgruppe zu fast 90% Ubiquitin-positiv. Dagegen sind bei der Alzheimerdemenz 40% der AT8-positiven senilen Plaques Ubiquitin-negativ, wobei diese Ubiquitin-negativen Plaques zu fast 100% auch Chromogranin negativ sind.

ChromograninA-positive Plaques sind, nach morphologischer Betrachtung in der  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie, in beiden Kollektiven hauptsächlich diffus.

Setzt man die Theorie der Plaqueentwicklung durch die verschiedenen morphologischen Stadien voraus, so scheint ChromograninA ein Marker zu sein, der sich schon ab den frühen Phasen der Bildung neuritischer Komponenten von senilen Plaques darstellen lässt [Davies et Mann 1993, Munoz 1991]. Seine mögliche Rolle in der Plaquepathogenese ist in der Literatur diskutiert. Hierbei reichen die Interpretationen von einer ‚benignen‘, unabhängig von der neurofibrillären Pathologie auftretenden Erscheinung [Yashuhara et al. 1994a], bis zu einem essentiellen Teil eines hierarchischen Modelles der Plaquepathogenese [Wang et Munz 1995]. Zur Frage nach Persistenz oder späterem Verlust der ChromograninA-Positivität im Verlauf der Entwicklung der senilen Plaques kann mit den Ergebnissen der

vorliegenden Studie keine genaue Aussage gemacht werden. Ein gehäuftes Vorkommen ChromograninA-positiver Plaques in Kombination mit einer ebenfalls vorliegenden AT8-Immunreaktivität in Gehirnen der DAT könnte für eine Persistenz des Chromogranins auch in späteren Plaquestadien sprechen.

Die Berücksichtigung der morphologischen Plaqueklassifikation ist hier nur begrenzt hilfreich, da in dieser Gruppe sehr viele diffuse, nur wenige klassische und keine dense-core Plaques zu beobachten sind. Auf der anderen Seite findet man in Gehirnen von Alzheimerpatienten auch Plaques, die AT8-positiv, aber ChromograninA-negativ sind. Unter ihnen sind neben vielen diffusen sowohl klassische als auch dense-core Plaques, also morphologisch wahrscheinlich spätere Entwicklungsstadien. Diese Beobachtung legt zumindest den Verdacht nahe, dass es in einigen Plaques zu einem späteren Verlust der ChromograninA-Positivität kommen könnte. Abschließend kann daher festgehalten werden, dass ein seniler Plaque des M. Alzheimer zunächst neben A $\beta$ -Aggregation auch eine positive Immunreaktivität für ChromograninA zu zeigen scheint. Mit fortschreitender Neuritendegeneration im Bereich dieses Plaques scheint sich auch eine positive Reaktion für hyperphosphoryliertes Tauprotein zu zeigen. Weiter könnte ChromograninA dann in diesem älteren Plaque bestehen oder im Rahmen folgender neuronaler Umbauprozesse nicht mehr nachzuweisen sein. Eine ChromograninA-Positivität scheint hier fast regelhaft mit einer Ubiquitin-Immunreaktivität kombiniert zu sein.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in zwei Posterbeiträgen auf der 53. DGNN Jahrestagung am 9.-11. Oktober 2008 in Würzburg präsentiert und in der Acta Neuropathologica Volume 116, Number 3, September 2008 publiziert:

### **Immunohistological profile of senile plaques in Alzheimer's disease brains and brains of non-demented elderly persons**

M.B. Jünemann (1), D.-A. Eschbach (1), K. da Silva (1), K. Kuchelmeister (1), (2)  
(1) Institute for Neuropathology, University of Gießen, D-35392 Gießen, Germany;  
(2) Institute for Neuropathology, University of Bonn, D-53105 Bonn, Germany

Senile plaques (SP) are important histopathological findings in Alzheimer's disease (AD) but can also be found in brains of non-demented elderly persons (NDEP). In addition to differences in localization and density, there are indications that SP in AD and NDEP show different immunohistological staining patterns.

We immunohistologically examined 41 AD brains and 10 NDEP brains (frontal and occipital cortex and hippocampus) using antibodies against  $\beta$ -protein, tau protein (antibody AT8 and a polyclonal tau antibody), ubiquitin and chromogranin A. Most of the SP in NDEP showed chromogranin A- and ubiquitin-positive components but only rare and sparse AT8-positivity. In AD brains, SP with chromogranin A-positive components mostly were AT8-immunoreactive as well. But here also numerous SP with AT8-positive, chromogranin A-negative components could be detected.

Our findings suggest that chromogranin A-immunopositivity may be an early but possibly not obligate or often only transient event in SP formation.



Justus-Liebig-Universität  
Gießen

## Immunhistologisches Profil seniler Plaques in Gehirnen bei M. Alzheimer und nicht-dementen älteren Menschen

M. B. Jünemann<sup>1</sup>, D.-A. Eschbach<sup>1</sup>, K. da Silva<sup>1</sup>, K. Kuchelmeister<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Neuropathologie der Universität Gießen,

<sup>2</sup>Institut für Neuropathologie der Universität Bonn



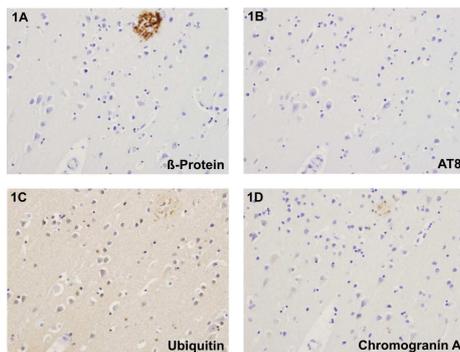
### Einleitung

Senile Plaques (SP) sind ein wichtiger histopathologischer Befund beim M. Alzheimer (Alzheimer's disease = AD), können aber auch häufig in Gehirnen nicht-dementen älterer Menschen (non demented elderly persons = NDEP) nachgewiesen werden. Neben Unterschieden in Dichte und Verteilung der SP bei AD und bei NDEP gibt es auch Hinweise auf unterschiedliche immunhistologische Markierungsmuster der SP bei AD und NDEP, z. B. hinsichtlich ihres Verhaltens in der Chromogranin A-Immunhistologie.

### Material und Methoden

Von 41 Gehirnen mit AD (klinische Angaben über dementielles Syndrom plus passende Neuropathologie), die in einem Obduktionszeitraum von 21 Jahren entnommen wurden und 10 Gehirnen alterskorrelierter NDEP mit  $\beta$ -Protein-positiven SP wurden jeweils 3 Paraffinblöcke (frontaler Kortex, Hippocampus und okzipitaler Kortex) in Serienschnitten immunhistologisch untersucht.

Es wurden Antikörper gegen  $\alpha$ -Synuclein,  $\beta$ -Protein, Tau-Protein (monoklonaler Antikörper AT 8 und polyklonaler Tau Antikörper), Ubiquitin und Chromogranin A verwendet.



### Ergebnisse

#### NDEP:

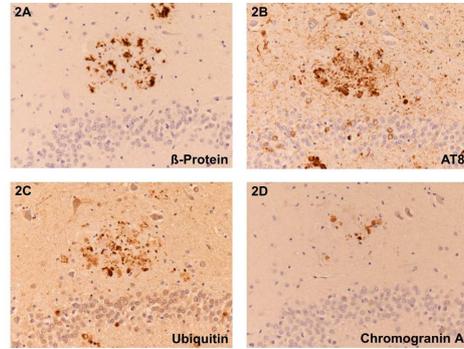
Bei einer semiquantitativen Auswertung der Dichte immunreaktiver SP mit den verschiedenen Antikörpern, zeigte sich, dass ein großer Teil der  $\beta$ -Protein-positiven SP bei NDEP auch eine Chromogranin A- und Ubiquitin-Immunreaktivität aufwies. Es fanden sich hier aber nur sehr selten AT8-immunreaktive SP.

Beim Serienschnittvergleich zeigten Chromogranin A-positive SP bei NDEP zu 100% eine AT8-Negativität, aber in 86% eine Ubiquitin-Positivität (Abb. 1A-D). Die seltenen AT8-positiven SP in Gehirnen von NDEP sind zur Hälfte Chromogranin A-positiv, zur Hälfte Chromogranin A-negativ und zu 80% Ubiquitin-positiv.

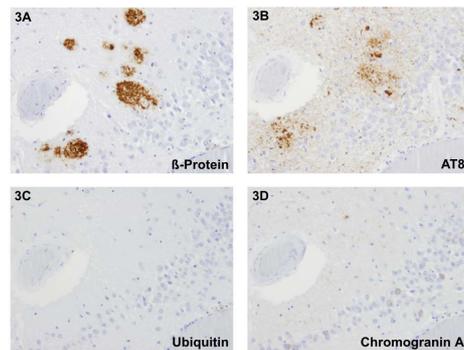
#### AD:

Bei den AD-Fällen sind AT8-positive Plaques insgesamt etwas häufiger als Chromogranin A-positive SP.

Beim Serienschnittvergleich wiesen Chromogranin A-positive SP zu 75% auch eine AT8-Immunreaktivität auf und zu 88% eine Ubiquitin-Positivität (Abb. 2 A-D).



Es lag in den AD-Gehirnen aber auch eine sehr große Zahl AT8-positiver, Chromogranin A-negativer SP vor (Abb. 3A-D): Geht man von AT8-positiven SP aus, waren nur 27% dieser SP Chromogranin A-positiv und 60% Ubiquitin-positiv.



### Zusammenfassung und Diskussion

In Gehirnen von NDEP sind die  $\beta$ -Protein-immunreaktiven SP häufig auch Chromogranin A-positiv, während eine AT8-Immunreaktivität der SP hier nur sehr selten vorliegt. Bei den AD-Gehirnen sind dagegen AT8-positive SP häufiger als Chromogranin A-positive SP. Während dreiviertel der Chromogranin A-positiven SP bei AD AT8-positiv sind, sind umgekehrt AT8-positive SP bei AD in fast dreiviertel der Fälle Chromogranin A-negativ. Die äußerst seltenen AT8-positiven SP in Gehirnen von NDEP sind auch zur Hälfte Chromogranin A-negativ (aber zu 90% Ubiquitin-positiv).

Chromogranin A-positive SP (ob mit oder ohne AT8-Positivität) sind sowohl bei AD als auch bei NDEP zu fast 90% Ubiquitin-positiv. Dagegen sind bei AD 40% der AT8-positiven SP Ubiquitin-negativ, wobei diese Ubiquitin-negativen SP zu fast 100% auch Chromogranin A-negativ sind.

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Chromogranin A-Positivität ein frühes Ereignis bei der Bildung neuritischer Komponenten von SP darstellt, das aber möglicherweise nicht obligat, sondern nur fakultativ auftritt oder nur ein transientes Phänomen ist. Chromogranin A-Positivität scheint fast immer mit einer Ubiquitin-Immunreaktivität kombiniert zu sein.

## **Alpha-synuclein-immunohistology and immunohistological findings of senile plaques in dementia with lewy bodies and Alzheimer's disease brains and brains of non-demented elderly persons**

D.-A. Eschbach (1), M.B. Jünemann (1), K. da Silva (1), K. Kuchelmeister (1), (2)  
(1) Institute for Neuropathology, University of Gießen, D-35392 Gießen, Germany;  
(2) Institute for Neuropathology, University of Bonn, D-53105 Bonn, Germany

Neuropathological autopsy studies on the presence of Alpha-synuclein as a component of senile plaques (SP) in Alzheimer's disease (AD) are remarkably rare and include only a small number of cases. The recorded results are controversial. SP can also be found in dementia with Lewy bodies (DLB) and in brains of non-demented elderly persons (NDEP).

Little is known about immunohistological differences of SP pathology in these three groups.

Immunohistology of 41 AD brains, 11 DLB brains and 10 brains of NDEP (frontal and occipital cortex and hippocampus) was performed using antibodies against  $\alpha$ -synuclein, beta-protein, tau protein (antibody AT8 and a polyclonal tau antibody), ubiquitin and chromogranin A.

We found no unequivocal  $\alpha$ -synuclein-positivity in SP of all cases.

Analysis of the immunohistological profile of individual SP showed differences between the three groups: In AD brains SP with chromogranin A-positive components showed mostly AT8-immunopositivity as well, while in DLB chromogranin A-positive SP were mostly AT8-negative. In NDEP brains chromogranin A-positivity of SP was frequent, but only rare and sparse AT8-positivity in SP could be detected. Our findings suggest that SP in DLB brains may be more closely related to SP in NDEP than in AD brains.



Justus-Liebig-Universität  
Gießen

## Alpha-Synuclein-Immunhistologie und immunhistologische Befunde seniler Plaques in Gehirnen bei Demenz mit Lewy-Körpern, M. Alzheimer und nicht-dementen älteren Menschen



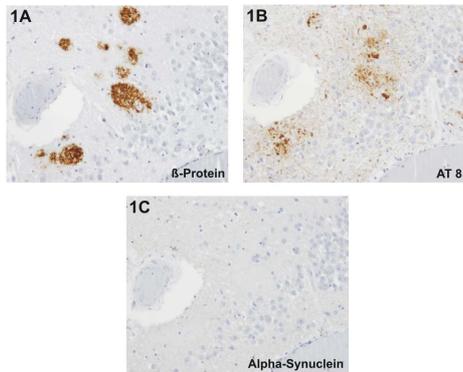
D.-A. Eschbach<sup>1</sup>, M. B. Jünemann<sup>1</sup>, K. da Silva<sup>1</sup>, K. Kuchelmeister<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Neuropathologie der Universität Gießen,

<sup>2</sup>Institut für Neuropathologie der Universität Bonn

### Einleitung

Neuropathologische Autopsiestudien über die  $\alpha$ -Synuclein-Immunhistologie in senilen Plaques (SP) beim M. Alzheimer (Alzheimer's disease = AD) sind bemerkenswert selten und betreffen meist nur kleine Fallzahlen. Die berichteten Ergebnisse sind sehr unterschiedlich und z. T. widersprüchlich. SP können auch bei der Demenz mit Lewy-Körpern (dementia with Lewy bodies = DLB) und in Gehirnen nicht-dementer älterer Menschen (non-demented elderly persons = NDEP) gefunden werden. Nur wenig ist bekannt über mögliche Unterschiede der immunhistologischen Befunde der SP in diesen drei Gruppen.



### Material und Methoden

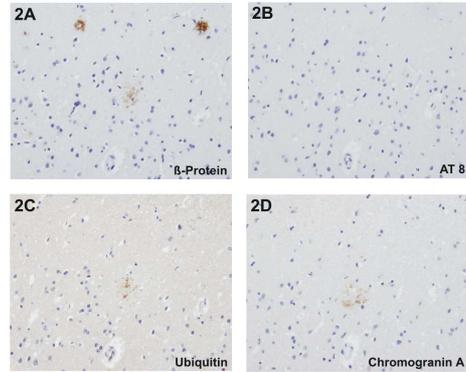
Wir haben Paraffinschnitte von 41 Gehirnen mit AD (klinische Angaben über dementielles Syndrom plus passende Neuropathologie, Obduktionszeitraum von 21 Jahren), von 11 Gehirnen mit DLB und von 10 Gehirnen alterskorrelierter NDEP mit  $\beta$ -Protein-positiven SP in Serienschnitten von jeweils 3 Paraffinblöcken (frontaler Kortex, Hippocampus, okzipitaler Kortex) immunhistologisch untersucht. Es wurden Antikörper gegen  $\alpha$ -Synuclein,  $\beta$ -Protein, Tau-Protein (monoklonaler Antikörper AT 8 und polyklonaler Tau Antikörper), Ubiquitin und Chromogranin A verwendet.

### Ergebnisse

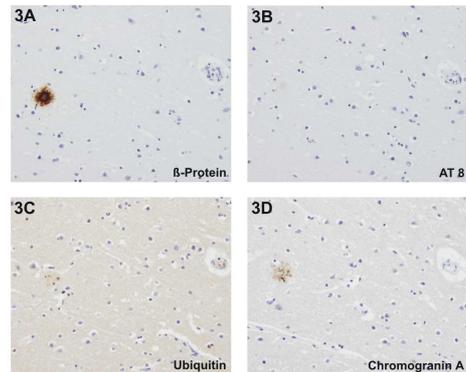
In allen AD-Fällen lag keine  $\alpha$ -Synuclein-Immunreaktivität in den SP vor (**Abb. 1A-C**). Auch in den DLB- und den NDEP-Fällen war keine  $\alpha$ -Synuclein-Immunreaktivität in den SP nachzuweisen.

Bei einer semiquantitativen Auswertung zeigte sich, dass in den NDEP-Gehirnen nur ganz wenige AT8-positive SP vorlagen. In der Chromogranin A-Immunhistologie wurden hier aber doch zahlreiche SP markiert. Diese waren zu 100% AT8-negativ, aber zu 86% Ubiquitin-positiv (**Abb. 2A-D**) (siehe Posterbeitrag Jünemann et al.).

In den DLB-Fällen lagen deutlich mehr AT8-positive SP als in den NDEP-Gehirnen vor.



Es fanden sich aber auch hier zahlreiche Chromogranin A-positive SP. Diese waren in fast dreiviertel (74%) der Fälle AT8-negativ und in 91% der Fälle Ubiquitin-positiv (**Abb. 3A-D**). Dieses immunhistologische Muster der SP mit Chromogranin A-Positivität und AT8-Negativität ist aber in den AD-Fällen (siehe Posterbeitrag Jünemann et al.) sehr selten, so dass SP bei DLB immunhistologisch offenbar mehr Ähnlichkeiten mit SP bei NDEP aufweisen als mit SP bei AD.



### Zusammenfassung und Diskussion

Eine  $\alpha$ -Synuclein-Immunreaktivität von SP konnten wir weder bei AD noch bei DLB noch bei NDEP mit SP nachweisen. SP bei DLB und bei NDEP wiesen häufiger eine Chromogranin A-Positivität (fast immer mit Ubiquitin-Positivität) und AT8-Negativität auf, was bei AD-Fällen (siehe Posterbeitrag von Jünemann et al.) sehr selten ist. Dies könnte möglicherweise für ein früheres Stadium der Entwicklung neuritischer Plaquekomponenten von SP bei DLB im Vergleich zu AD sprechen oder vielleicht sogar auf eine pathogenetisch unterschiedliche Entwicklung neuritischer Plaquekomponenten von SP bei DLB und AD hinweisen.

### 4.3 Zusammenfassung

Senile Plaques sind ein bedeutender histopathologischer Befund des M. Alzheimer. Aber auch in den Gehirnen nicht-dementer älterer Personen sind sie, wenn auch mit unterschiedlicher Verteilung und Dichte, zu finden. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf ein unterschiedliches immunhistologisches Färbeverhalten solcher seniler Plaques in diesen Kollektiven, unter anderem auch im Hinblick auf die ChromograninA-Immunhistologie.

Frontale, hippokampale und okzipitale Serienschritte von 41 Gehirnen mit einer klinisch und neuropathologisch gesicherten Alzheimer-Demenz aus einem Obduktionszeitraum von 21 Jahren und 10 Gehirne alterskorrelierter nicht-dementer älterer Personen mit  $\beta$ -Protein-positiven senilen Plaques wurden hier immunhistologisch untersucht. Hierbei wurden Antikörper gegen  $\beta$ -Protein, Tau-Protein (monoklonaler Antikörper AT8 und polyklonaler Tau-Antikörper), Ubiquitin und ChromograninA verwendet.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen erwartungsgemäß ein erhöhtes Vorkommen  $\beta$ -Amyloid-positiver seniler Plaques in den Gehirnen von an M. Alzheimer erkrankter Menschen im Vergleich zu dem Kollektiv nicht-dementer älterer Personen. Die semiquantitative Auswertung der Dichte immunreaktiver seniler Plaques im Vergleichskollektiv zeigte, dass ein großer Teil der hier  $\beta$ -Protein-positiven senilen Plaques ebenfalls eine ChromograninA- und Ubiquitin-Immunreaktivität aufwies. In diesem Kollektiv ließen sich, im Gegensatz zu dem DAT-Kollektiv, kaum AT8-positive senile Plaques nachweisen. Der Serienschrittvergleich ChromograninA-positiver Plaques ergab bei 100%iger AT8-Negativität in 86% der Fälle auch eine Ubiquitin-Positivität.

In den Gehirnen des Alzheimer-Kollektivs waren die AT8-positiven senilen Plaques häufiger vertreten, als die ChromograninA-positiven senilen Plaques. Bei dem Vergleich der Serienschritte wiesen hier, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, ChromograninA-positive senile Plaques zu 75% auch eine AT8-Immunreaktivität und zu 88% eine Ubiquitin-Positivität auf. Von AT8-Positivität ausgehend zeigten sich hier nur 27% der senilen Plaques ChromograninA positiv und 60% Ubiquitin-positiv.

Zusammenfassend ergibt sich hieraus, dass in den Gehirnen nicht-dementer älterer Menschen  $\beta$ -Protein-immunreaktive senile Plaques häufig auch ChromograninA- und Ubiquitin- positiv sind. Eine AT8-Immunreaktivität ist hier fast regelhaft nicht zu finden. Im Gegensatz dazu sind in den Gehirnen des Alzheimer-Kollektivs dreiviertel der untersuchten ChromograninA positiven Plaques auch AT8-positiv. In diesem Kollektiv sind die AT8-positiven Plaques häufiger als die ChromograninA-positiven Plaques und AT8-immunreaktive senile Plaques in dreiviertel der Fälle ChromograninA negativ. ChromograninA-Positivität geht in der vorliegenden Untersuchung fast regelhaft mit einer positiven Immunreaktion für Ubiquitin einher.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann eine ChromograninA-Positivität als ein frühes Ereignis im Verlaufe der Ausbildung neuritischer Plaquekomponenten interpretiert werden. Dies scheint nicht obligat, sondern fakultativ aufzutreten oder könnte auch als ein transientes Phänomen vorliegen.

## 4.4 Abstract

Senile plaques are important histopathological findings in Alzheimer's disease. Differing in distribution and density they can also be found in brains of non-demented elderly persons. In addition they seem to vary in immunohistological staining pattern, for example in case of ChromograninA- immunopositivity.

We immunohistologically examined frontal, hippocampal and occipital serial sections of 41 clinically and neuropathologically proved AD brains and 10 brains of age-correlated non-demented elderly persons with increased amount of  $\beta$ -amyloid-positive plaque-load by using antibodies against  $\beta$ -protein, tau-protein (monoclonal AT8-antibody and polyclonal Tau-antibody), ubiquitin and chromograninA.

Findings confirm an increased amount of  $\beta$ -amyloid-positive senile plaques in brains of Alzheimer's disease compared to the brains of non-demented elderly persons. Semiquantitative analyses of density of immunoreactive senile plaques in our control group showed a big amount of  $\beta$ -protein-positive plaques staining positive for chromograninA and ubiquitin as well. AT8-immunopositive plaques could hardly be found in these brains. The analysis of serial sections based on chromograninA-positive senile Plaques revealed 100% AT8-negativity and 86% ubiquitin-positivity.

In brains of Alzheimer's disease AT8-immunoreactive plaques seemed to be more common than chromograninA-positive. The analysis of serial sections in this collective showed chromograninA-positive senile plaques staining positive for AT8 in 75% and for ubiquitin in 88%. AT8-immunoreactive senile plaques showed only in 27% chromograninA-positivity and 60% ubiquitin-positivity.

$\beta$ -protein-positive senile plaques in brains of non-demented elderly persons seem to be often chromograninA- and ubiquitin- positive as well. A positive reaction for AT8 can hardly be found here. In contrast three-quarter of chromograninA-positive plaques in Alzheimer's disease stain positive for AT8. In this collective AT8-positive Plaques are more frequent than chromograninA-positive ones and three-quarter stain negative for chromograninA. ChromograninA-positivity seems to be accompanied by ubiquitin-positivity.

According to these results a positive reaction for chromograninA may be seen as an early but possibly not obligate or often only transient event in formation of neuritic plaque-component.

## 5 Anhang

### 5.1 Tabellen

Nummer	Block	Zusätze
DAT 1	A,G,H,F	okzip. fehlt
DAT 2	A,D,F,E,I	
DAT 3	G,H,E	frontal+okzip. fehlt
DAT 4	F,G,D,A,J	
DAT 5	A,C,E,F	okzip. fehlt
DAT 6	H,I,D,L	front. fehlt
DAT 7	G,H,E,A	okzip. fehlt
DAT 8	A,E,I	okzip. fehlt
DAT 9	2,3,8,9	front. fehlt
DAT 10	A,H,I,J	okzip. fehlt
DAT 11	10,2,5,6	front. fehlt
DAT 12	7,8,3,1,5?	okzip. fehlt
DAT 13	A,E,G,H	okzip. fehlt
DAT 14	G,H,F,A,O	
DAT 15	I,J,H,A	okzip. fehlt
DAT 16	2,4,5,7,8	
DAT 17	A,L,F,H,G	
DAT 18	L,F,G,H	front. fehlt
DAT 19	8,9,2,3	okzip. fehlt
DAT 20	2,3,4,7,8	
DAT 21	8,9,3,1,5	
DAT 22	F,G,E,A	okzip. fehlt
DAT 23	A,B,I,G,J,K	
DAT 24	A,D,F,K,L	
DAT 25	B,K,N,O,P	
DAT 26	A,I,K,N,O	
DAT 27	A,E,C,K,L	
DAT 28	B,I,M,N,O	
DAT 29	C,H,M,O,P	
DAT 30	B,I,K,R,SX	
DAT 31	B,G,H,I,J	
DAT 32	B,E,K,M,N	
DAT 33	B,L,T,W,X	

Nummer	Block	Zusätze
DAT 34	A,J,P,R,S	
DAT 35	B,G,I,J,K	
DAT 36	B,K,N,O,P	
DAT 37	Q,W,N,T,U	
DAT 38	A,Q,M,T,K	
DAT 39	A,J,N,O,L	
DAT 40	B,N,J,P,Q	
DAT 41	A,F,H,J,K	
DAT 42	A,G,E,F,J,K	
DAT 43	A,J,N,K,P,Q	

**Tabelle 5.1: Blöcke zu DAT-Fällen**

Nummer	Block	Zusatz
KG 1	A, E, G	
KG 2	A, E, F	
KG 3	A, H, I	
KG 4	A; G; H	
KG 5	A, D, F	
KG 6	A, I, K	
KG 7	A, E, F	
KG 8	A, D, E	
KG 9	A, F, G	
KG 10	A, G, I	

**Tabelle 5.2: Blöcke zur Vergleichsgruppe**

Fall	Front., hippo., okzip. Dichte AT8	Braak/ CERAD
DAT 1	1- 5%	VI/B
	26- 50%	
DAT 2	6- 25%	VI/B
	26- 50%	
	6- 25%	
DAT 3		VI/C
	26- 50%	
DAT 4	26- 50%	VI/C
	26- 50%	
	6- 25%	
DAT 5	0%	V/B
	6- 25%	
DAT 6		VI/B
	26- 50%	
	6- 25%	
DAT 7	6- 25%	VI/B
	26- 50%	
DAT 8	26- 50%	VI/B
	6- 25%	
DAT 9		V/B
	26- 50%	
	1- 5%	
DAT 10	26- 50%	VI/B
	26- 50%	
DAT 11		IV/A
	6- 25%	
	6- 25%	
DAT 12	6- 25%	V/B
	26- 50%	

DAT 13	1- 5%	VI/B
	6- 25%	
DAT 14	6- 25%	V/C
	6- 25%	
	6- 25%	
DAT 15	51- 75%	VI/C
	51- 75%	
DAT 16	1- 5%	V/B
	26- 50%	
	6- 25%	
DAT 17	6- 25%	VI/B
	26- 50%	
	26- 50%	
DAT 18	6- 25%	IV/A
	1- 5%	
DAT 19	6- 25%	IV/A
	1- 5%	
DAT 20	26- 50%	IV/A
	1- 5%	
	6- 25%	
DAT 21	26- 50%	VI/C
	26- 50%	
	26- 50%	
DAT 22	1- 5%	VI/B
	1- 5%	
DAT 23	26- 50%	VI/B
	51- 75%	
	6- 25%	
DAT 24	6- 25%	IV/A
	6- 25%	
	6- 25%	

DAT 25	6- 25%	V/B
	26- 50%	
	26- 50%	
DAT 26	6- 25%	IV/A
	6- 25%	
	0%	
DAT 27	6- 25%	VI/B
	26- 50%	
	6- 25%	
DAT 28	26- 50%	IV/B
	51- 75%	
	26- 50%	
DAT 29	51- 75%	V/B
	51- 75%	
	6- 25%	
DAT 30	0%	IV/A
	6- 25%	
	0%	
DAT 31	6- 25%	IV/B
	26- 50%	
	1- 5%	
DAT 32	0%	III/A
	6- 25%	
	0%	
DAT 33	26- 50%	V/C
	26- 50%	
	6- 25%	
DAT 34	1- 5%	V/A
	6- 25%	
	0%	
DAT 35	6- 25%	V/C
	6- 25%	
	6- 25%	
DAT 36	1- 5%	V/A
	6- 25%	
	0%	
DAT 37	26- 50%	VI/C
	6- 25%	
	26- 50%	

DAT 38	51- 75%	V/C
	51- 75%	
	26- 50%	
DAT 39	26- 50%	VI/C
	51- 75%	
	26- 50%	
DAT 40	6- 25%	VI/B
	51- 75%	
	51- 75%	
DAT 41	1- 5%	V/C
	1- 5%	
	26- 50%	
DAT 42	26- 50%	VI/C
	26- 50%	
	6- 25%	
DAT 43	6- 25%	VI/C
	6- 25%	
	6- 25%	

**Tabelle 5.3: Vergleich von Plaquedichte  
neur. AT8-pos. Plaques und CERAD/Braak,  
DAT-Gruppe**

Fall	Form	Braak/ CERAD
KG 1	0%	III/0
	0%	
	0%	
KG 2	0%	II/0
	0%	
	0%	
KG 3	0%	III/A
	1- 5%	
	0%	
KG 4	0%	II/B
	1- 5%	
	1- 5%	
KG 5	0%	III/A
	6- 25%	
	1- 5%	

KG 6	0%	III/A
	6- 25%	
	1- 5%	
KG 7	0%	III/B
	1- 5%	
	0%	
KG 8	0%	IV/A
	1- 5%	
	1- 5%	
KG 9	0%	III/0
	0%	
	0%	
KG 10	0%	VI/0
	0%	
	0%	

**Tabelle 5.4: Vergleich von Plaquedichte neur. AT8-pos. Plaques und CERAD/Braak, nicht-demente Menschen**

Fall	♀	♂	LJ	Braak/ CERAD	Klinik	Pathologie
DAT 1	X		90	VI/B	HOPS	Mäßiggrad. Hirnbasisarterienskler.
DAT 2	X		95	VI/B	Seit 2-3 Jahren aggressive Demenz	Kaum Arterioskler.
DAT 3		X	74	VI/C		Geringgrad. Hirnbasisarterienskler.
DAT 4		X	75	VI/C		Geringgrad. Arterioskler. der Hirnbasisart.
DAT 5	X		82	V/B		
DAT 6	X		79	VI/B		
DAT 7	X		74	VI/B		Zartwandige Hirnbasisart., geringgrad. Arteri <u>o</u> lskler.
DAT 8		X	72	VI/B		Geringgrad. Arterioskler. der Hirnbasisart.

Fall	♀	♂	LJ	Braak/ CERAD	Klinik	Pathologie
DAT 9	X		85	V/B	HOPS	Mäßiggrad. Arterio- und Arteriolo-skler.
DAT 10		X	79	VI/B		Geringgrad. Hirnbasisarterienskler., leichte Arteriolo-skler.
DAT 11		X	88	IV/A	HOPS	Deutliche Hirnbasisarterienskler., deutliche Arteriolo-skler.
DAT 12		X	83	V/B	HOPS	Hirnarteriensklerose
DAT 13	X		87	VI/B	Frontale Hyperostose	Zarte Hirnbasisart.
DAT 14	X		67	V/C		Zartwandige Hirnbasisart.
DAT 15	X		76	VI/C		Mittelgrad. Hirnbasisarterienstenose
DAT 16	X		84	V/B		
DAT 17	X		76	VI/B		
DAT 18			92	IV/A		
DAT 19		X	78	IV/A		
DAT 20	X		90	IV/A	HOPS	Arterio- Arteriolo-skler.
DAT 21	X		71	VI/C	Seit 2 Jahren bekannte Demenz	Arteriolo-skler.
DAT 22		X	81	VI/B		Keine Hirnbasisarterienskler.
DAT 23	X		86	VI/B		Mäßiggrad. Arterio- Arteriolo-skler.
DAT 24		X	78	IV/A	HOPS	Hochgrad. Hirnbasisarterienskler. deutliche Arteriolo-skler.
DAT 25	X		78	V/B		Geringgrad. Arterioskler. und hochgrad. Arteriolo-skler.
DAT 26		X	80	IV/A	HOPS	Hochgrad. Arterio- Arteriolo-skler.
DAT 27		X	79	VI/B		Mäßiggrad. Hirnbasisarterienskler.
DAT 28		X	81	IV/B		Geringgrad. Hirnbasisarterienskler., Arteriolo-skler.

Fall	♀	♂	LJ	Braak/ CERAD	Klinik	Pathologie
DAT 29	X		75	V/B		Arteriolskler., kein Anhalt für Hirnbasisarterioskler.
DAT 30	X		78	IV/A		Geringe Arterio- und mäßiggrad. Arteriolskler.
DAT 31		X	72	IV/B		Mittelgradige Arterio- und Arteriolskler.
DAT 32	X		79	III/A		Geringe Hirnbasisarterioskler., geringe Arteriolskler. Lewy Körperchen im Hirnstamm nachweisbar.
DAT 33		X	69	V/C		Amyloid- Angiopathie, deutliche Arteriolskler, Arterioskler., isokortikale Lewy Körperchen, multiple lakunäre Infarkte, Brückeninfarkt rechts
DAT 34		X	78	V/A		Mittel- bis hochgrad. Hirnbasisarterioskler. und deutliche Arteriolskler.
DAT 35		X	73	V/C		Leichte bis mäßige Arteriolskler., keine Veränderungen der Hirnbasisart.
DAT 36	X		81	V/A		Geringe Hirnbasisarterioskler., deutliche Arteriolskler.
DAT 37	X		80	VI/C		Deutliche Arteriolskler.
DAT 38	X		75	V/C		Geringe Hirnbasisarterioskler., Arteriolskler.
DAT 39		X	75	VI/C		
DAT 40	X		81	VI/B		Mäßiggrad. Hirnbasisarterioskler., geringgrad. Arteriolskler.
DAT 41		X	78	V/C		Geringgrad. Arterioskler., Arteriolskler.
DAT 42	X		77	VI/C		Mäßiggrad. Arterioskler. deutliche Arteriolskler.
DAT 43	X		55	VI/C		

**Tabelle 5.5: Fallkollektiv der Alzheimerpatienten**

Fall	♀	♂	LJ	Braak/ CERAD	Klinik	Pathologie
KG 1	X		72	III/O	Marcumartherapie, Herz-Kreislaufversagen	Mäßiggrad. Amyloidangiopathie, geringe Hirnbasisarterioskler., geringgrad. Arteriolskler.

Fall	♀	♂	LJ	Braak/ CERAD	Klinik	Pathologie
KG 2		X	72	II/O	Kardiale Dekompensation nach komplikationsträchtiger Sigmaresektion	Mäßiggrad. kongophile Amyloidangiopathie, Arterioskler.
KG 3		X	75	III/A	KHK, Vorderwandinfarkt	Mäßiggrad. Amyloidangiopathie
KG 4	X		85	II/B	Herz- Kreislaufversagen bei Myokardinfarkt	Mäßiggrad. Hirnbasisarterienskler. und Arterioloskler.
KG 5		X	82	III/A	Multiorganversagen bei kardiogenem Schock	Amyloidangiopathie
KG 6	X		86	III/A	Kardiale Dekompensation nach Cholezystektomie bei Aortenklappenstenose III°	Hirnbasisarterienskler.
KG 7	X		75	III/B	Aortenaneurysmen in A.ascendens und descendens, COPD, Hypertonie, Adipositas	Leichte Hirnbasisarterienskler.
KG 8		X	83	IV/A	Rupturiertes Bauchaortenaneurysma	Amyloidangiopathie, Hirnbasisarterienskler.
KG 9	X		82	III/O	Rechtsherzversagen nach Lungenembolie	Zerebrale Arterioloskler., leichte Hirnbasisarterienskler.
KG 10		X	69	VI/O	Akuter Myokardinfarkt, akutes Nierenversagen, Lungenödem bei Pneumonie, finale Asystolie bei therapierefraktärer Hyperkaliämie	Organisierte Mikroinfarkte bei status cribrosus der Stammganglien, mäßiggrad. Arterioskler. und Arterioloskler.,

**Tabelle 5.6: Fallkollektiv der nicht-dementen Menschen**

## 5.2 Bilder

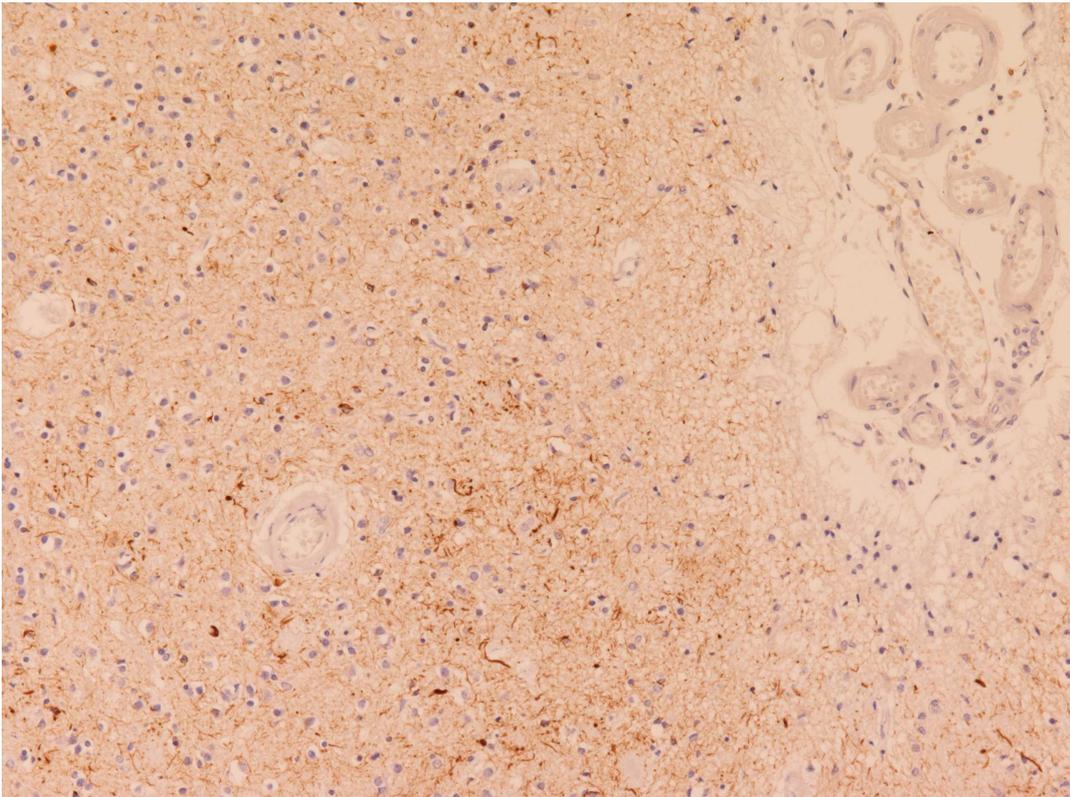


Abbildung 5.1a: DAT Tau-Protein AK

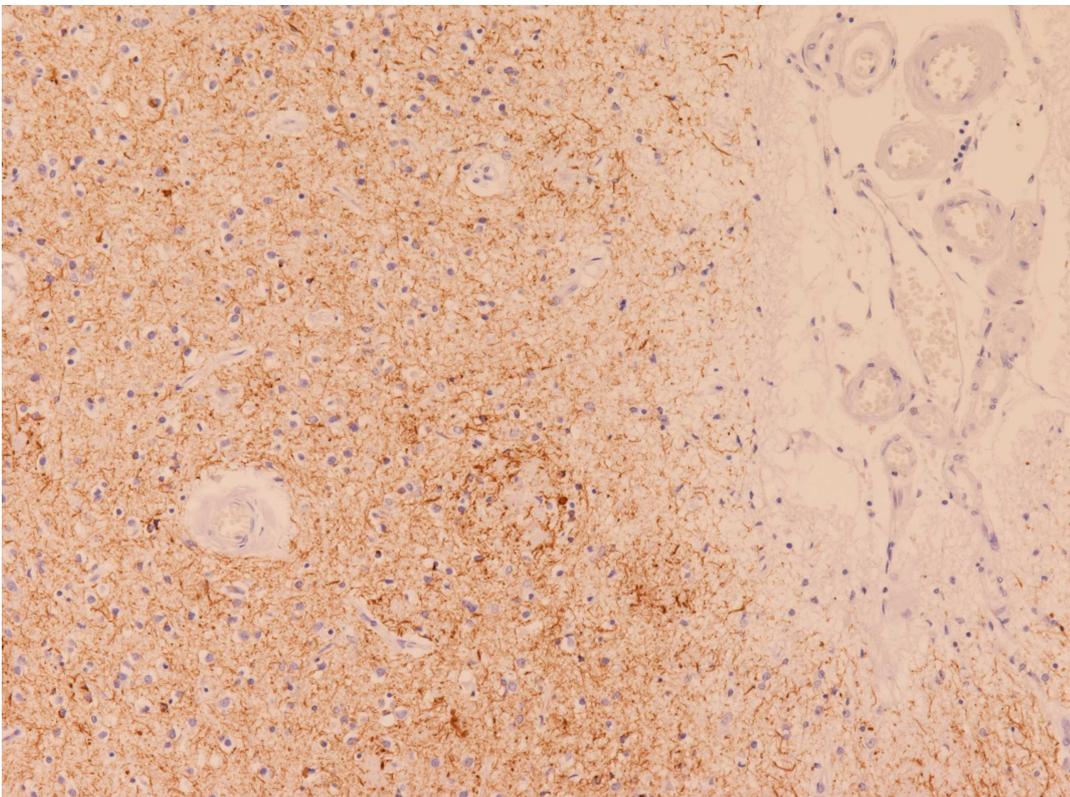
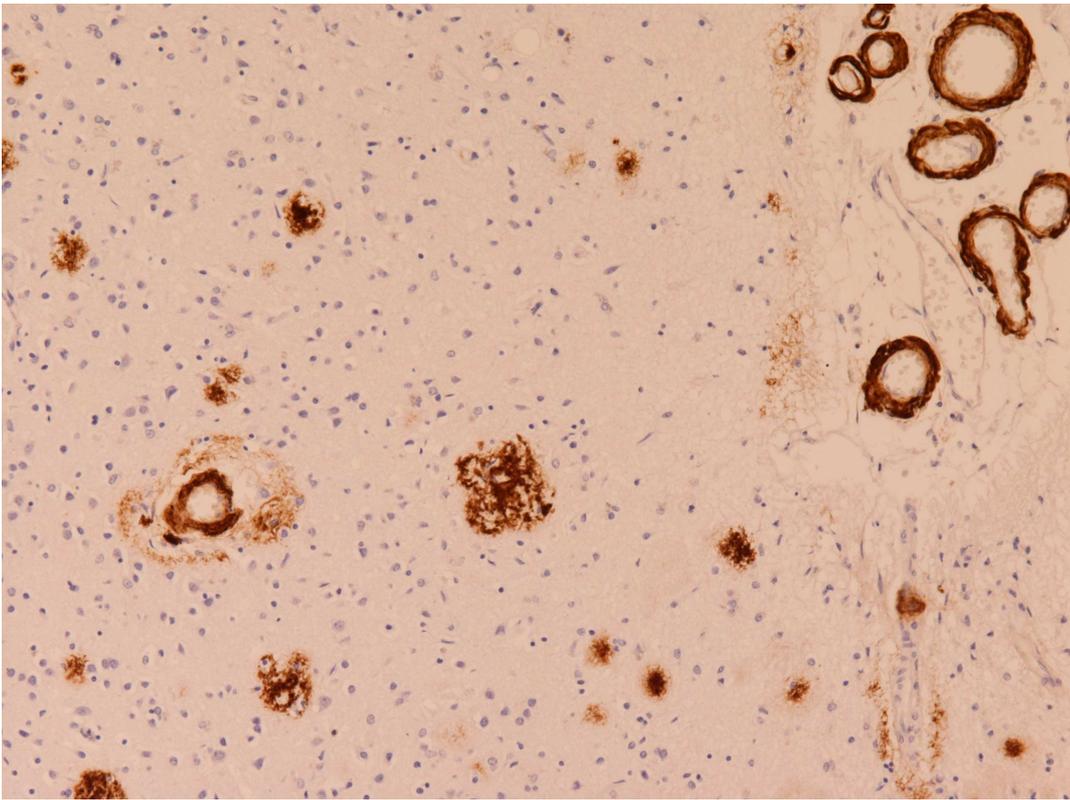
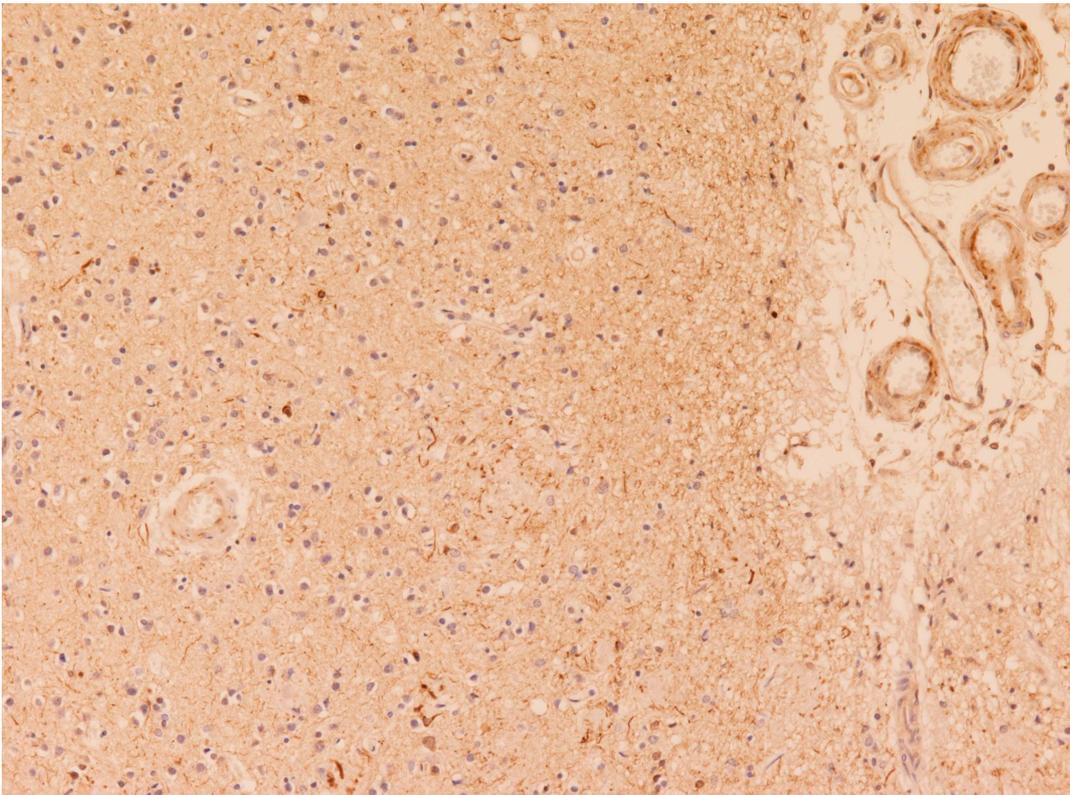


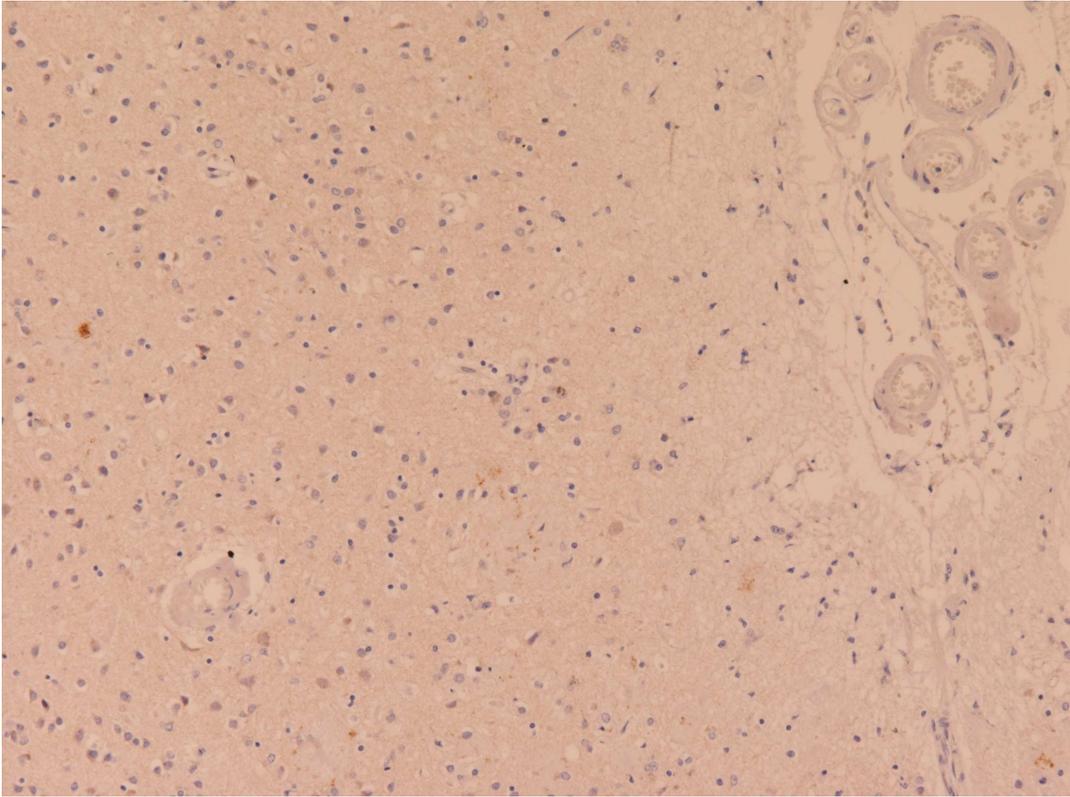
Abbildung 5.1b: DAT AT8 AK



**Abbildung 5.1c: DAT  $\beta$ -Amyloid AK**

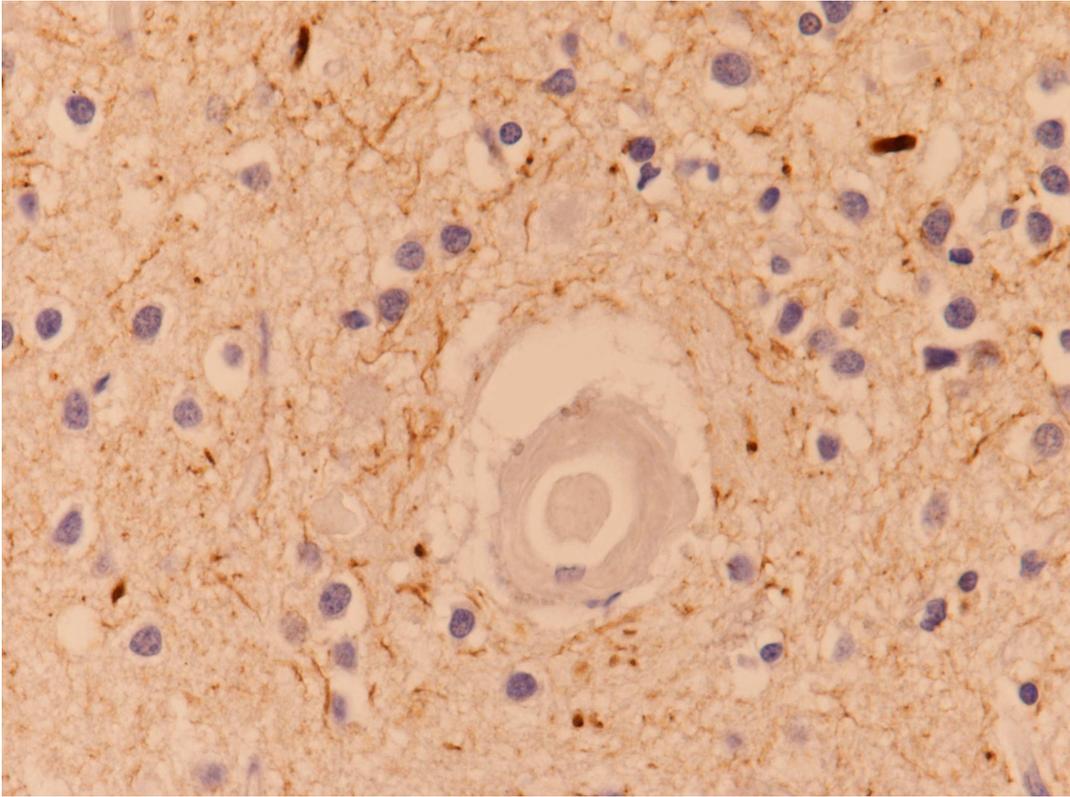


**Abbildung 5.1d: DAT Ubiquitin AK**

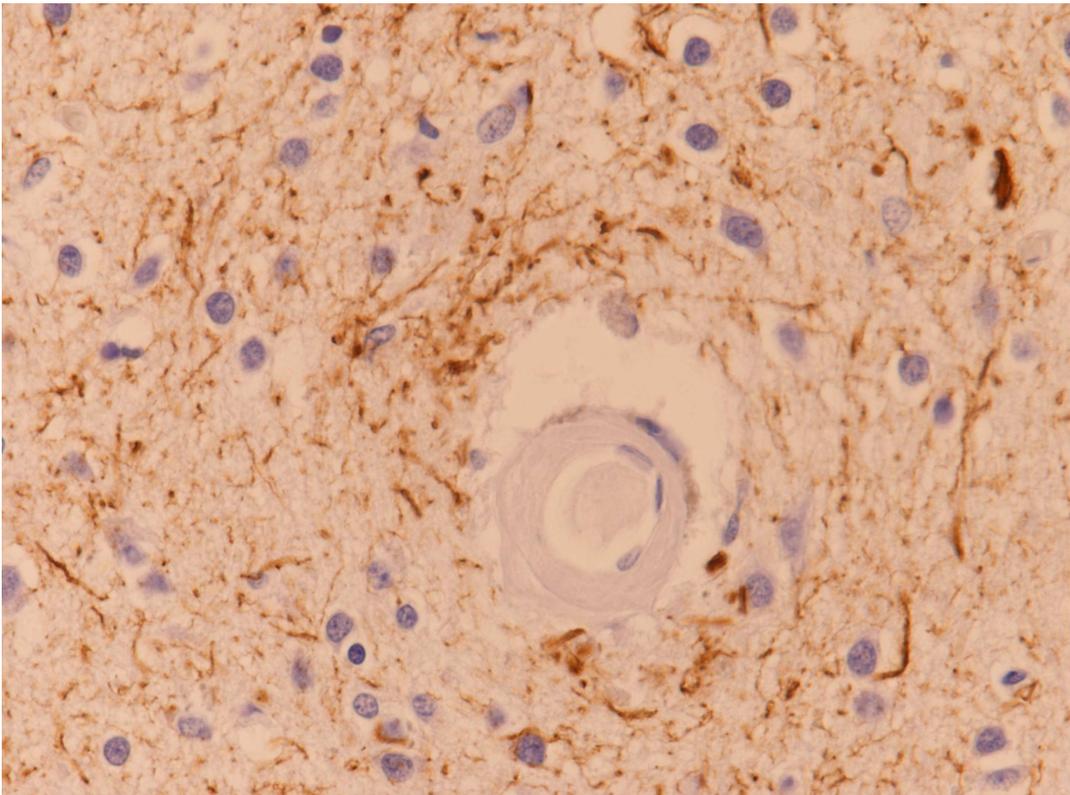


**Abbildung 5.1e: DAT ChromograninA AK**

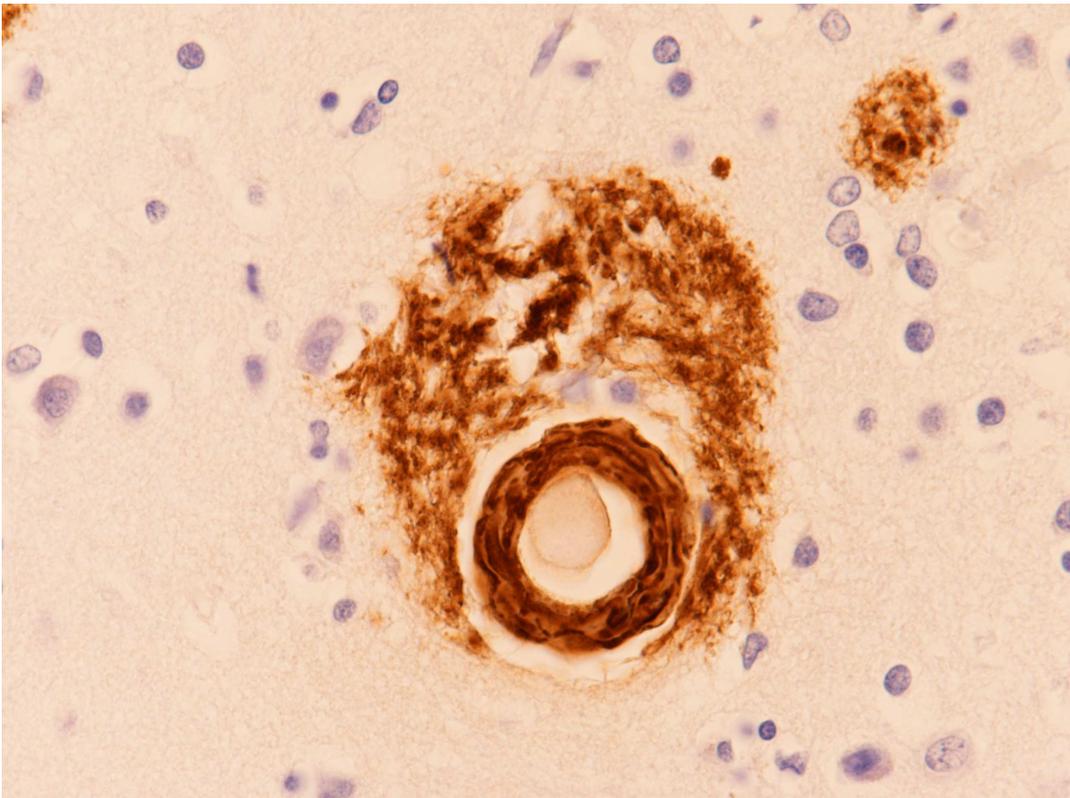
**Abbildungen 5.1a-5.1e: Darstellung eines ChromograninA-, AT8-,  $\beta$ -Amyloid- und Ubiquitin-positiven Plaques aus dem Kollektiv der DAT.**



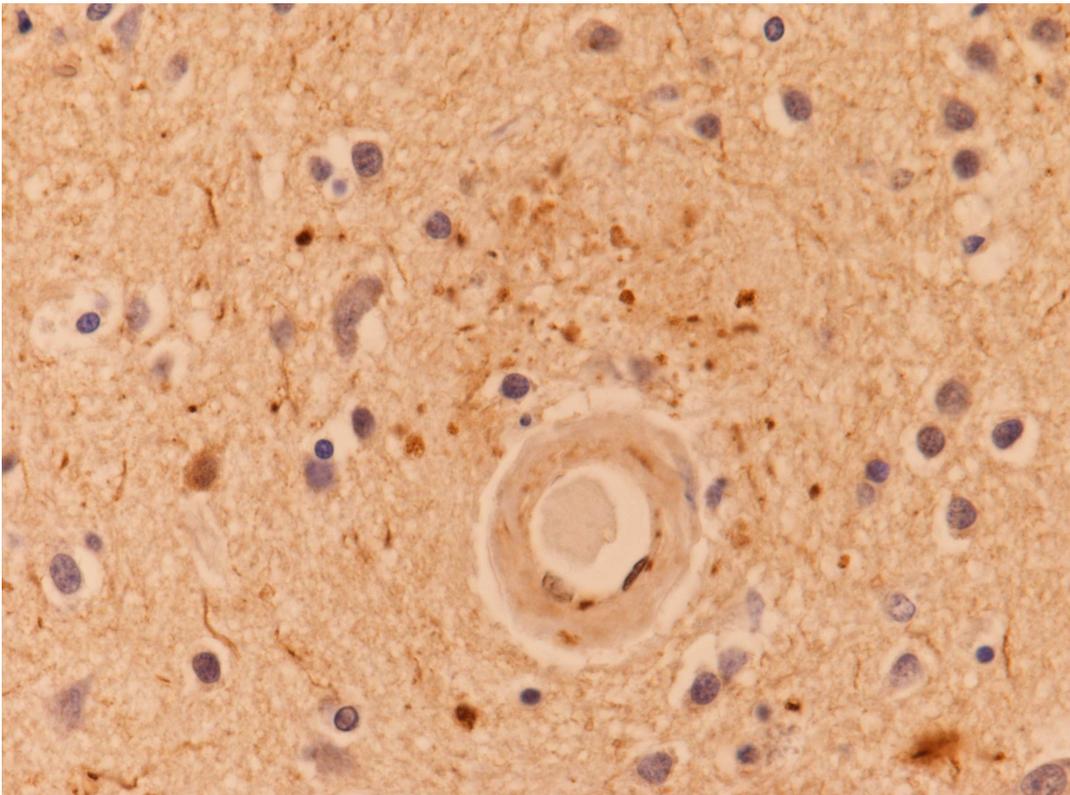
**Abbildung 5.2a: DAT Tau-Protein AK**



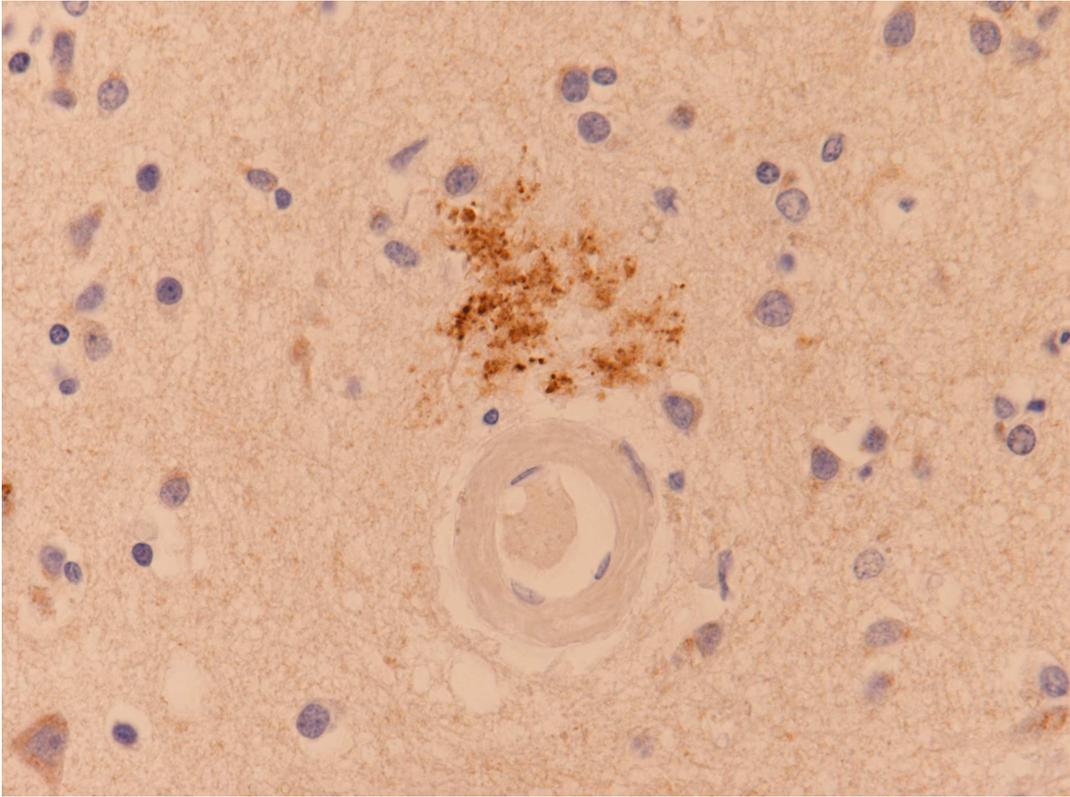
**Abbildung 5.2b: DAT AT8 AK**



**Abbildung 5.2c: DAT  $\beta$ -Amyloid AK**

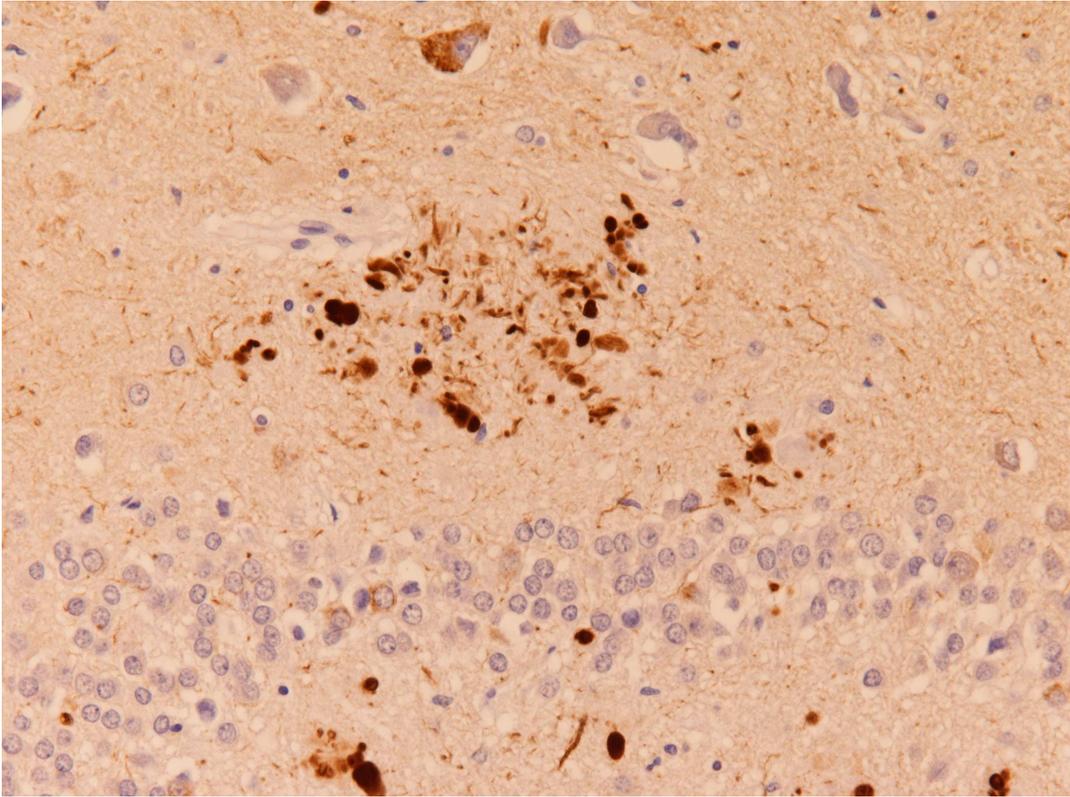


**Abbildung 5.2d: DAT Ubiquitin AK**

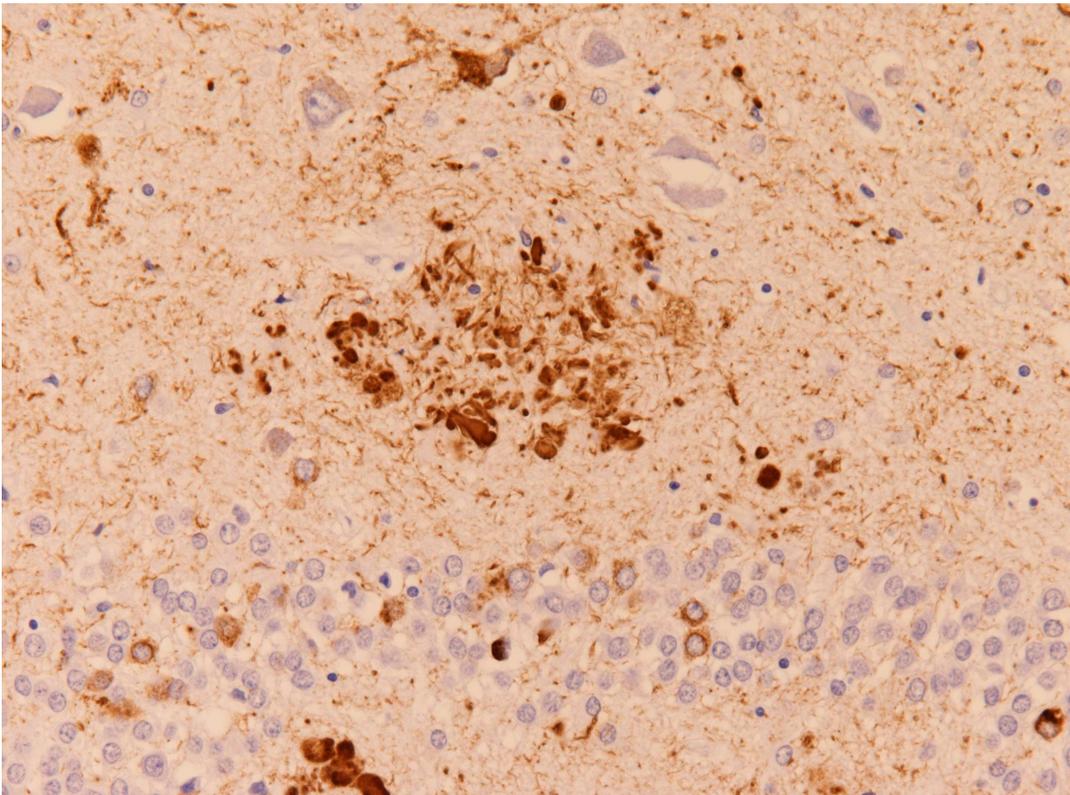


**Abbildung 5.2e: DAT ChromograninA AK**

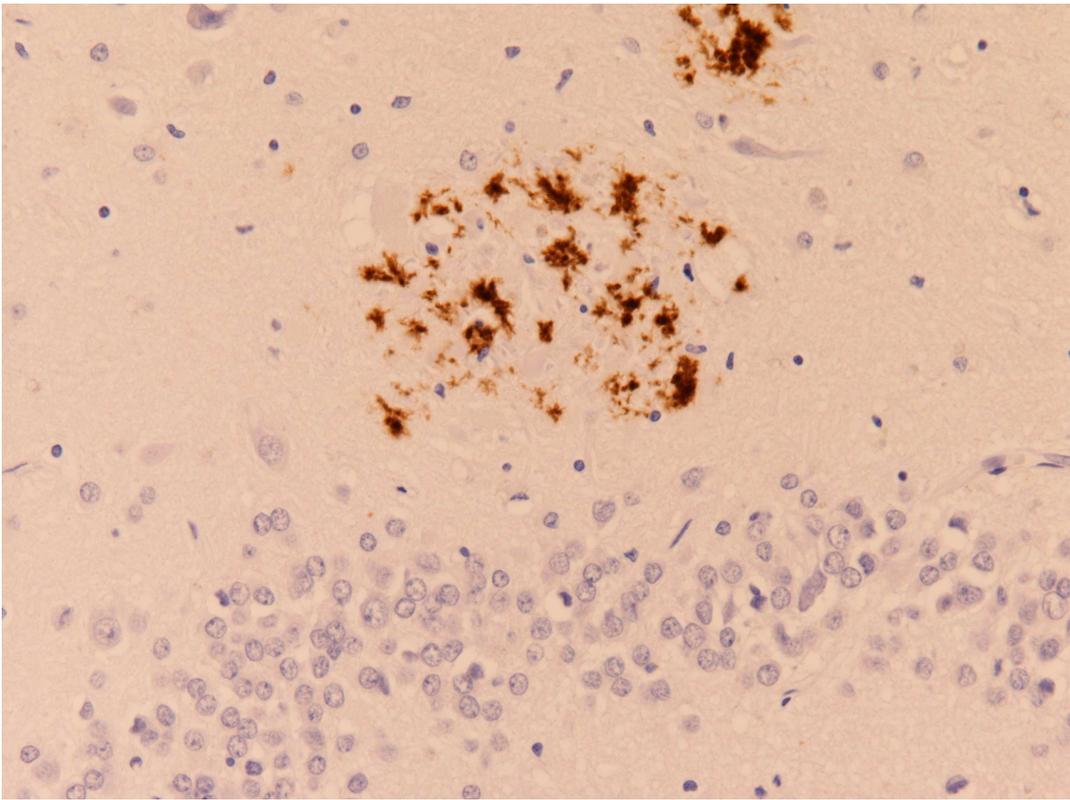
**Abbildung 5.2a- 5.2e: Darstellung eines ChromograninA-, AT8-,  $\beta$ -Amyloid- und Ubiquitin-positiven Plaques aus dem Kollektiv der DAT.**



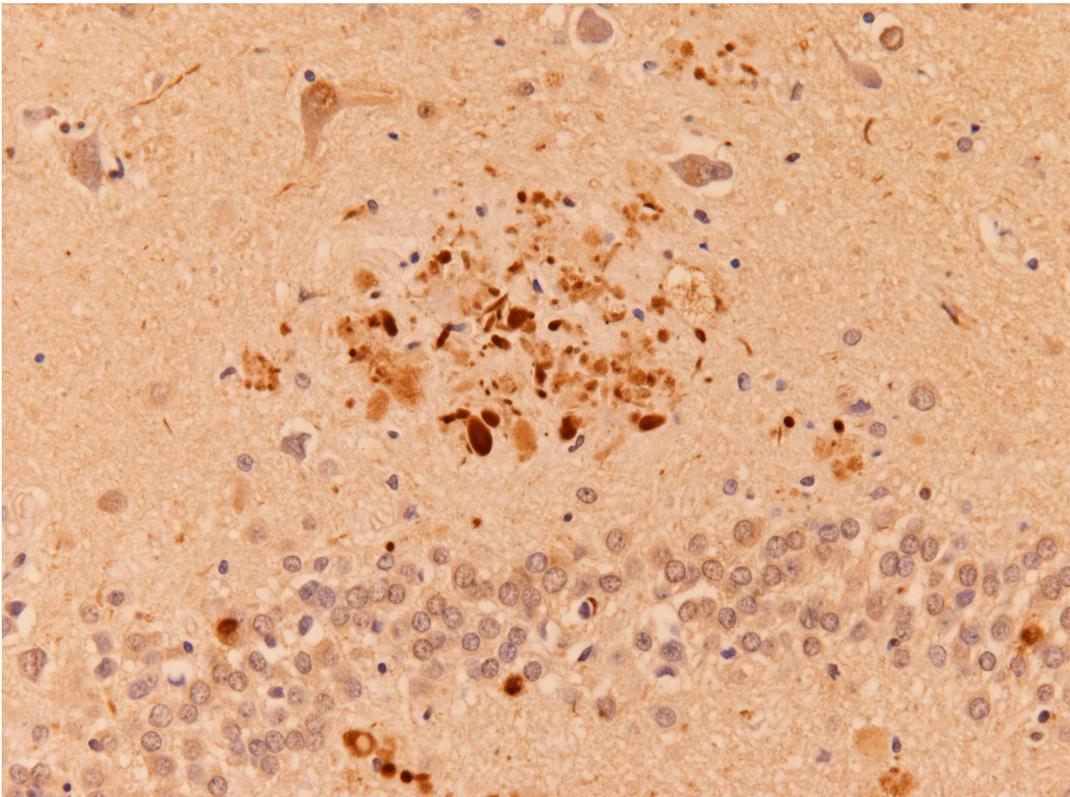
**Abbildung 5.3a: DAT Tau-Protein AK**



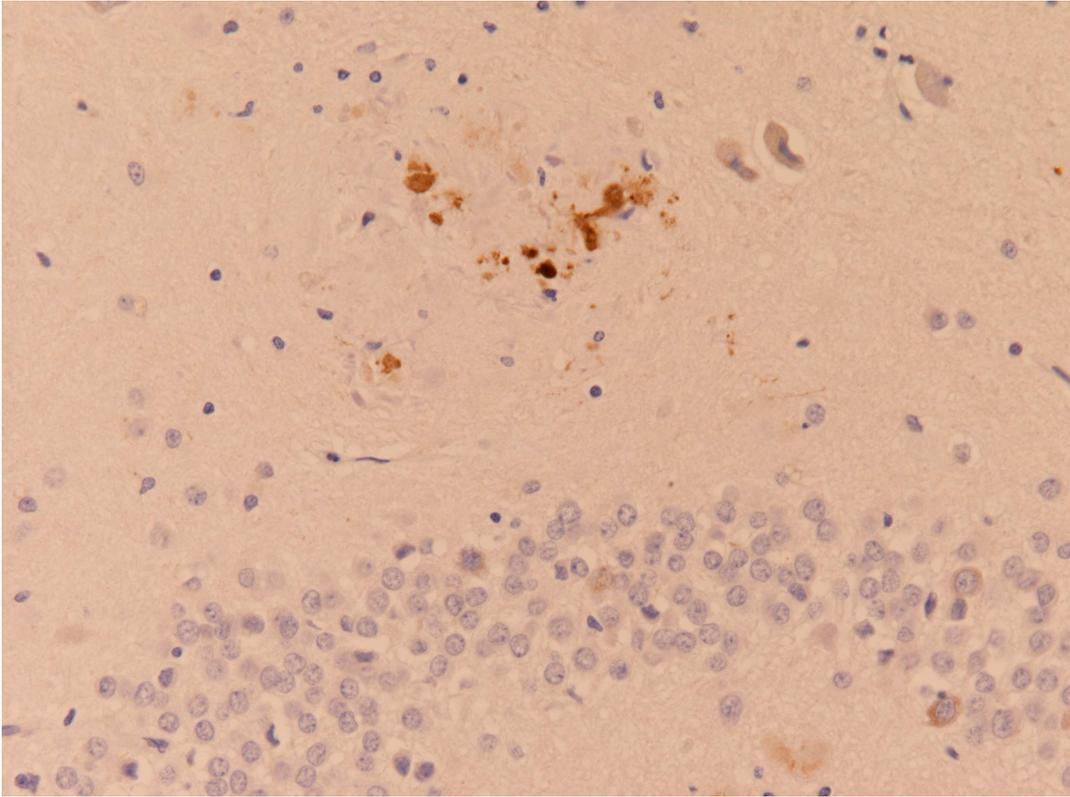
**Abbildung 5.3b: DAT AT8 AK**



**Abbildung 5.3c: DAT  $\beta$ -Amyloid AK**

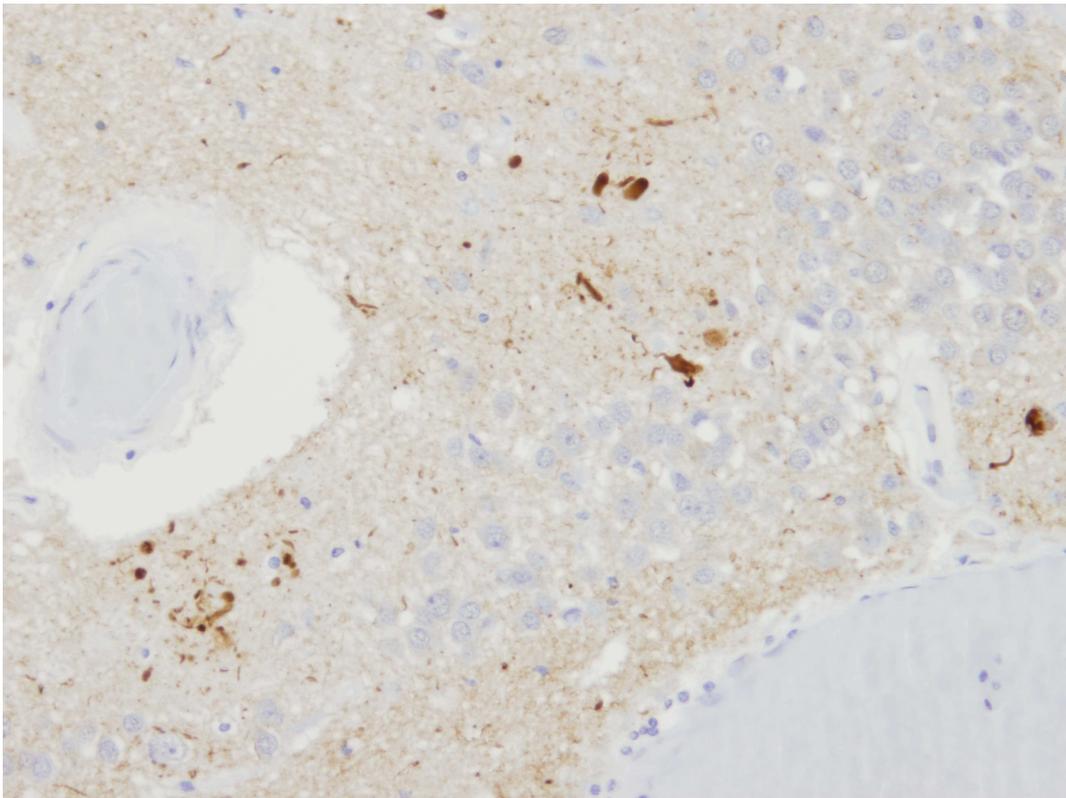


**Abbildung 5.3d: DAT Ubiquitin AK**

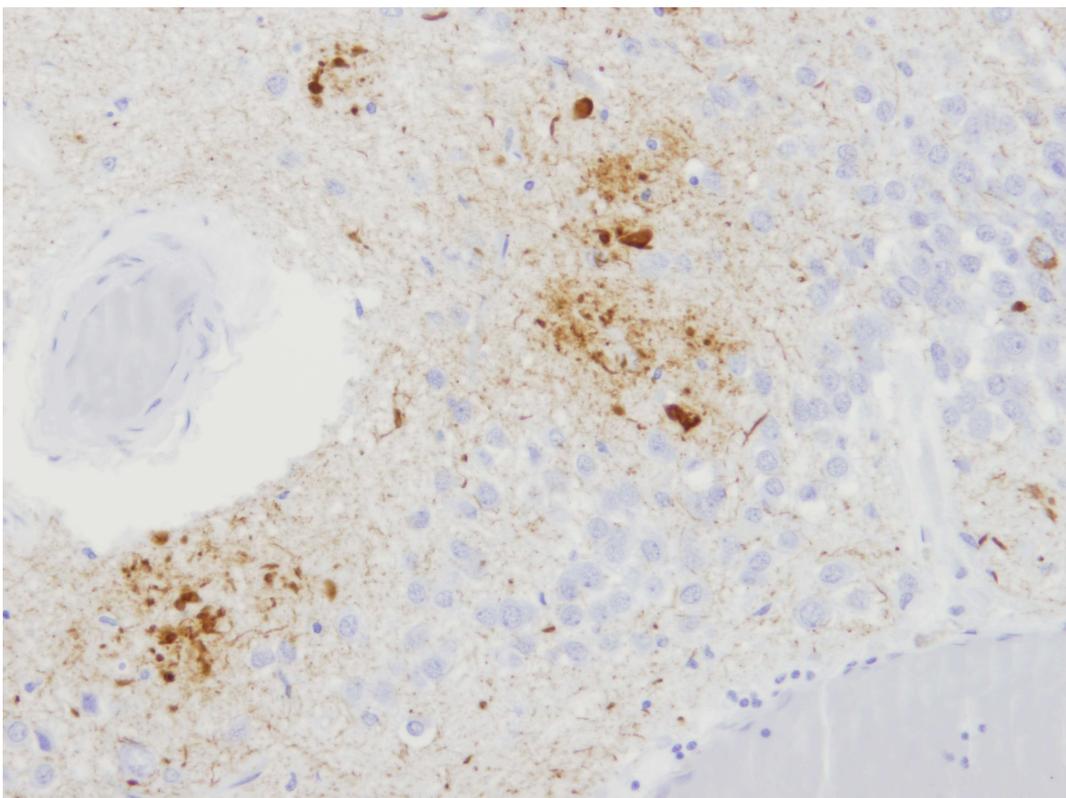


**Abbildung 5.3e: DAT ChromograninA AK**

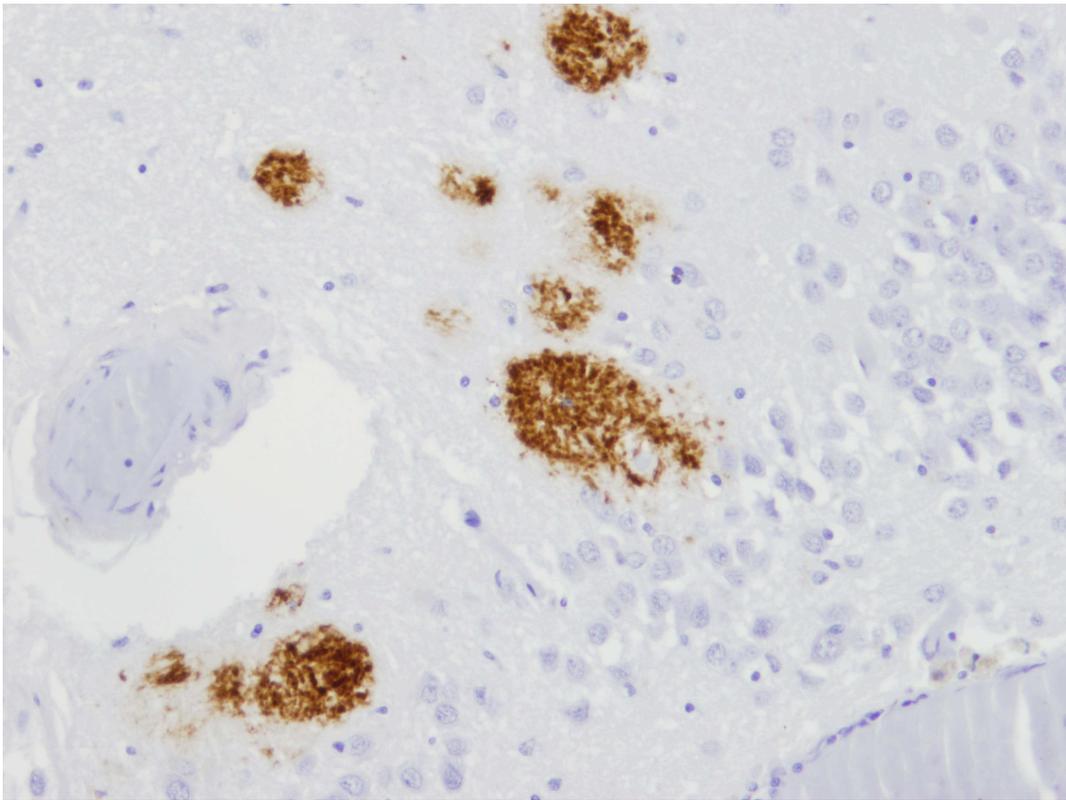
**Abbildungen 5.3a- 5.3e: Darstellung eines ChromograninA-, AT8-,  $\beta$ -Amyloid- und Ubiquitin-positiven Plaques aus dem Kollektiv der DAT.**



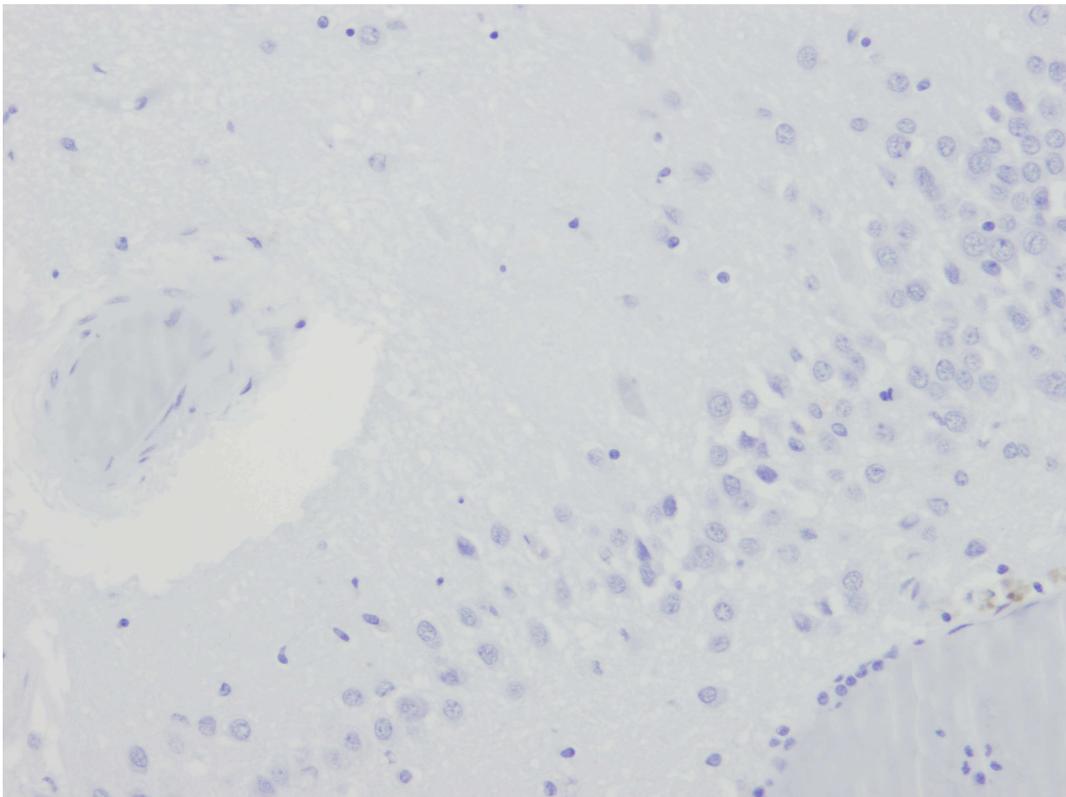
**Abbildung 5.4a: DAT Tau-Protein AK**



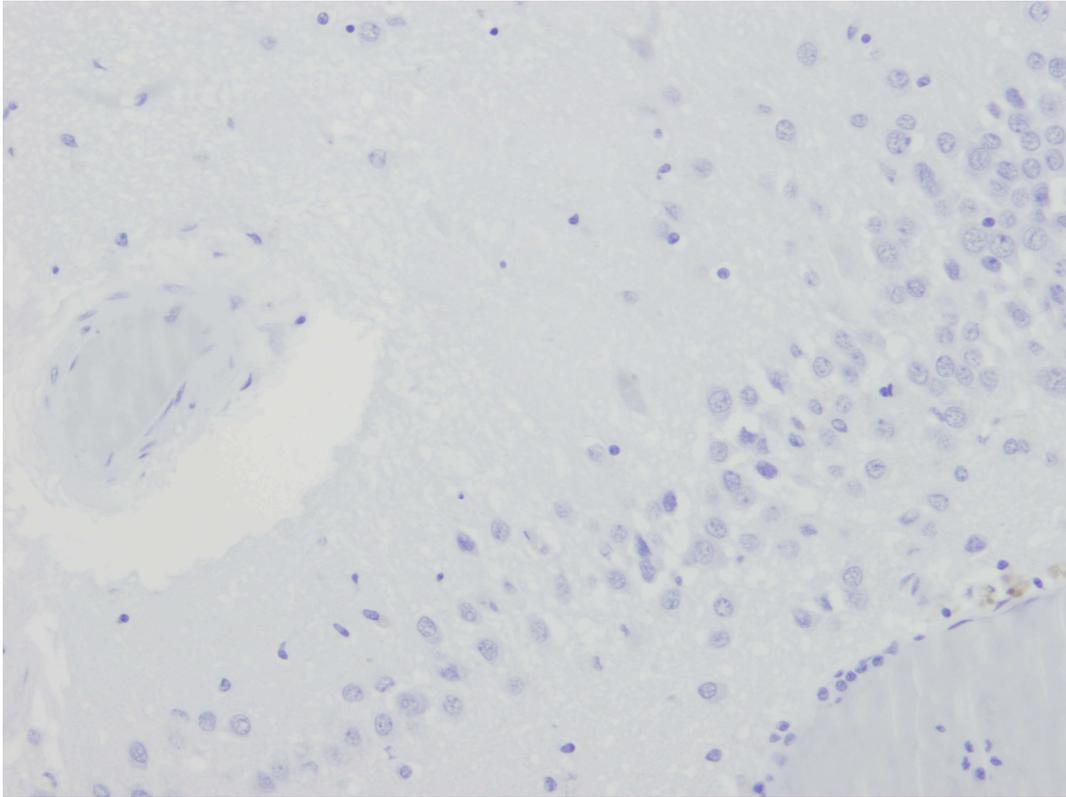
**Abbildung 5.4b: DAT AT8 AK**



**Abbildung 5.4c: DAT  $\beta$ -Amyloid AK**

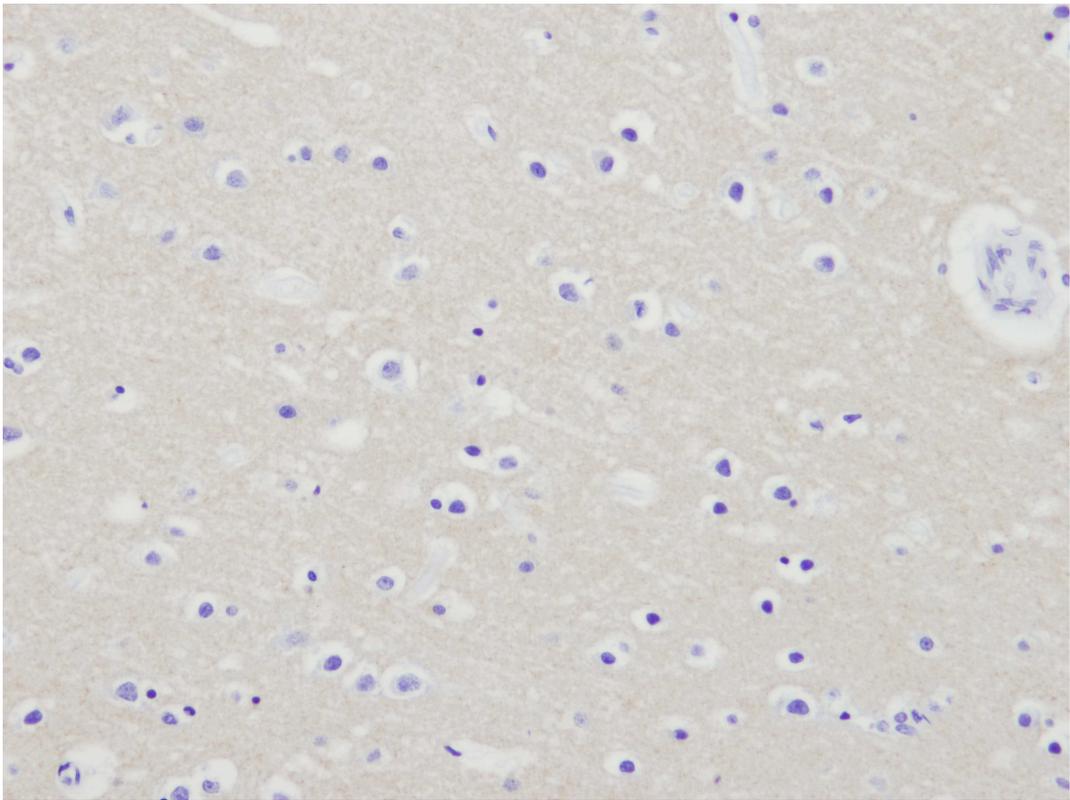


**Abbildung 5.4d: DAT Ubiquitin AK**

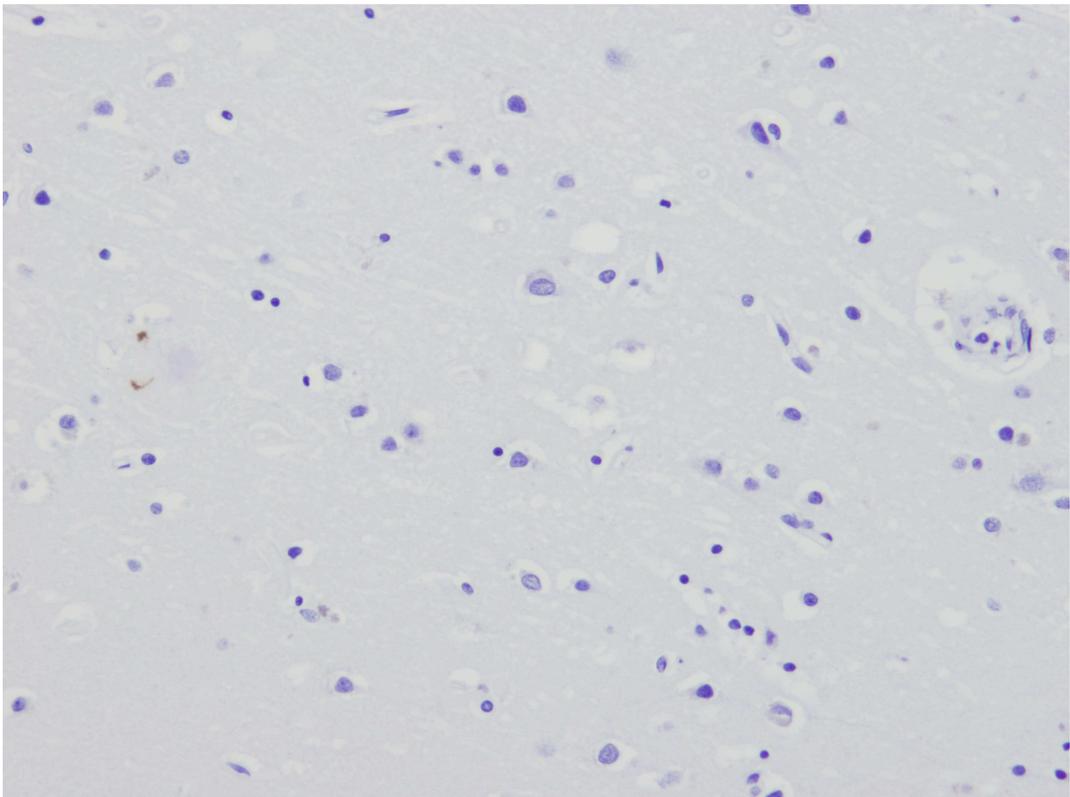


**Abbildung 5.4e: DAT ChromograninA AK**

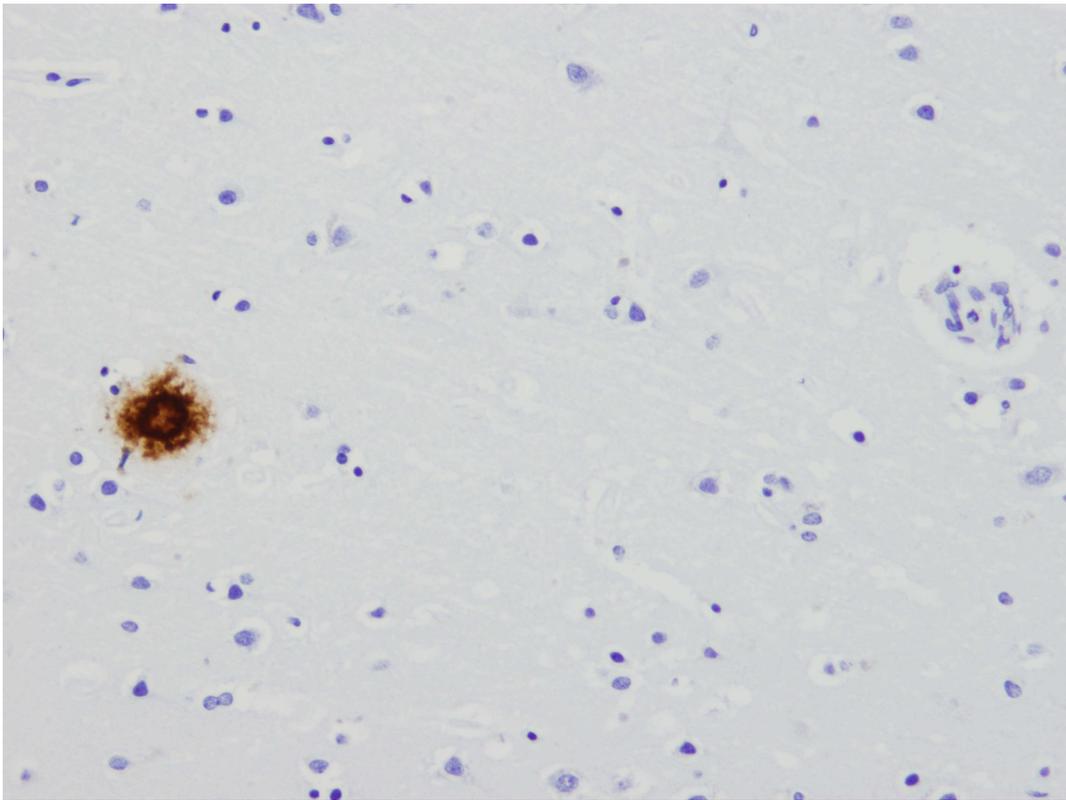
**Abbildungen 5.4a- 5.4e: Darstellung eines AT8- und A $\beta$ - positiven/ Ubiquitin- und ChromograninA-negativen Plaques aus dem Kollektiv der DAT.**



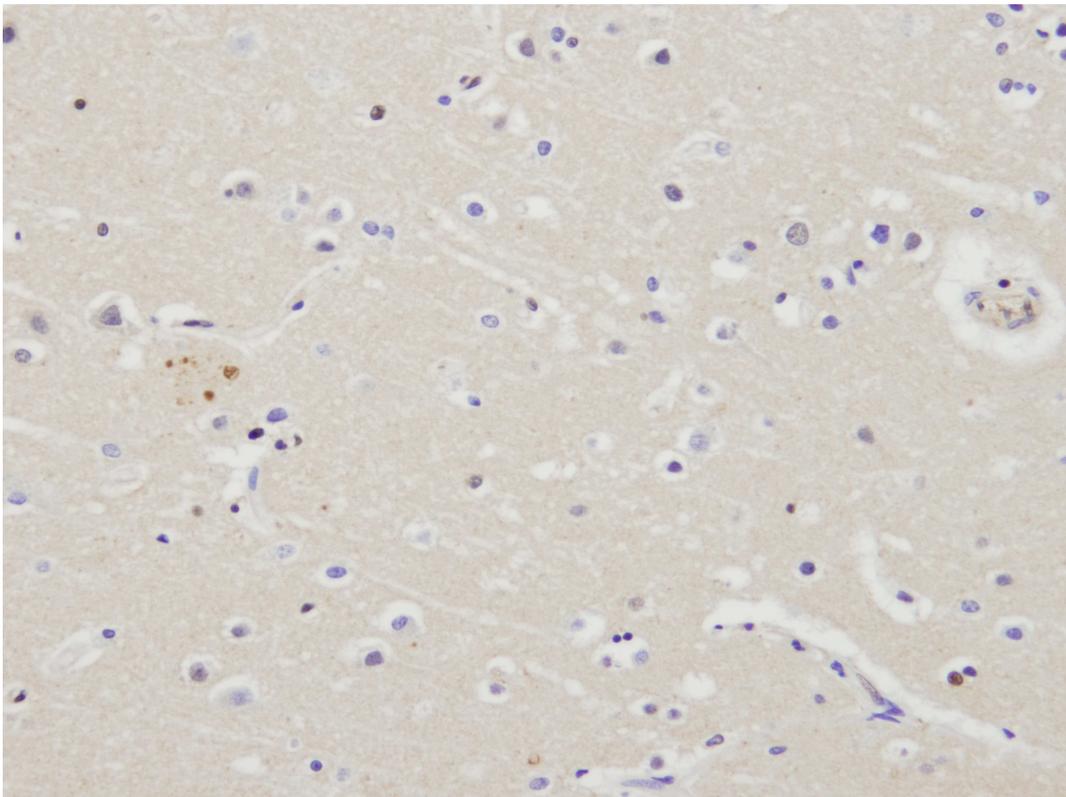
**Abbildung 5.5a: NDEP Tau-Protein AK**



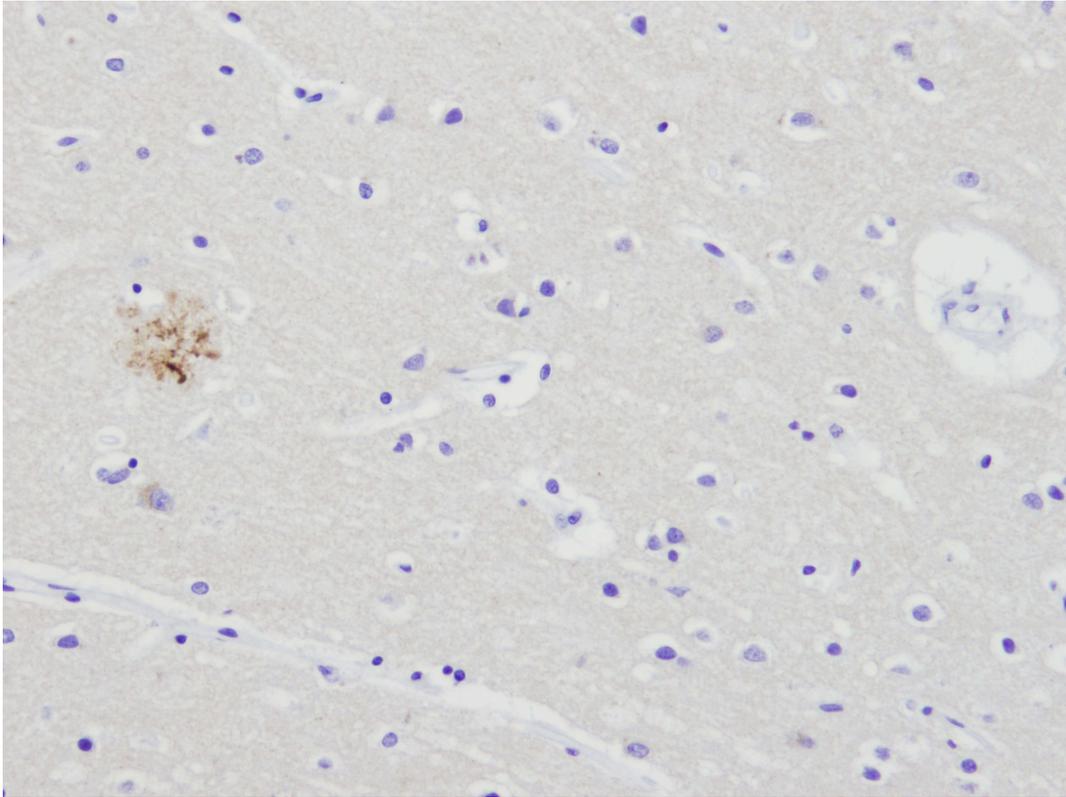
**Abbildung 5.5b: NDEP AT8 AK**



**Abbildung 5.5c: NDEP  $\beta$ -Amyloid AK**

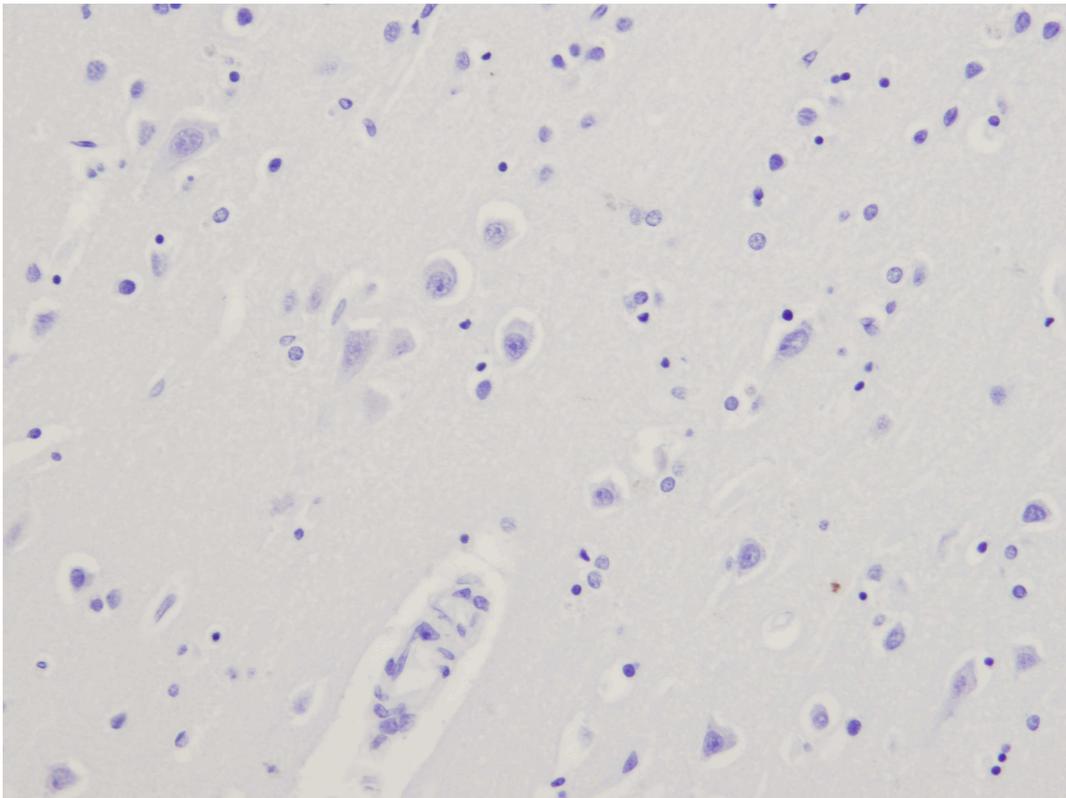


**Abbildung 5.5d: NDEP Ubiquitin AK**

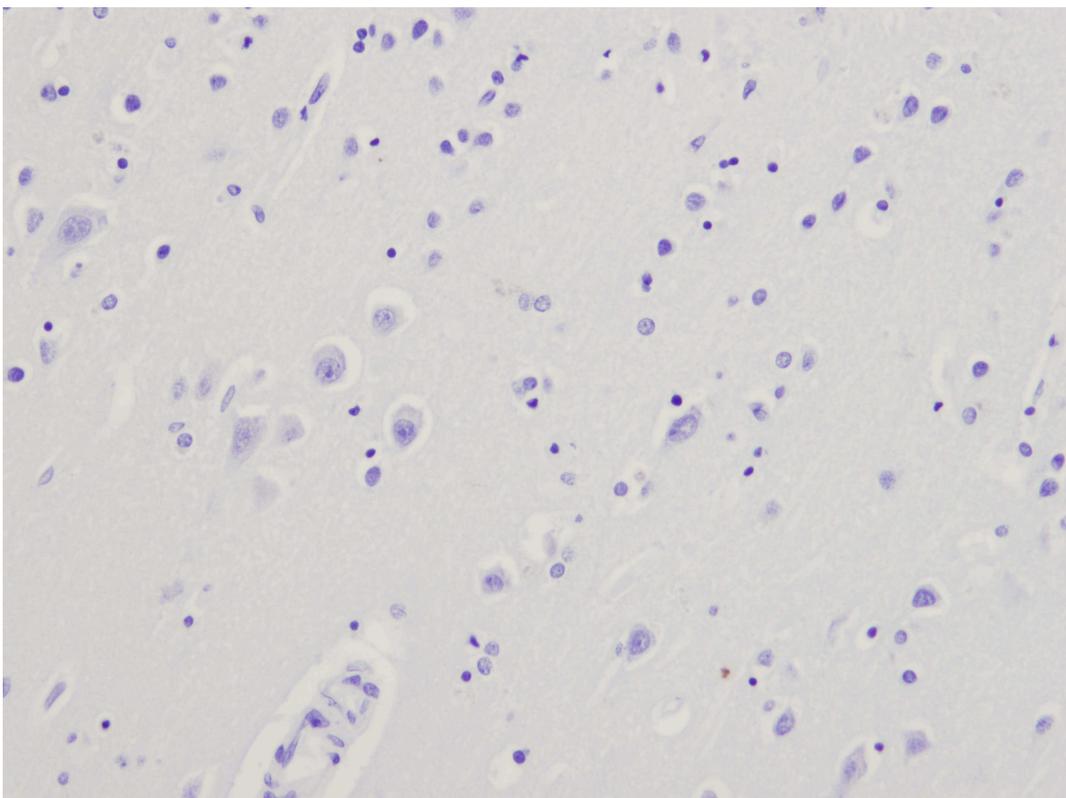


**Abbildung 5.5e: NDEP ChromograninA AK**

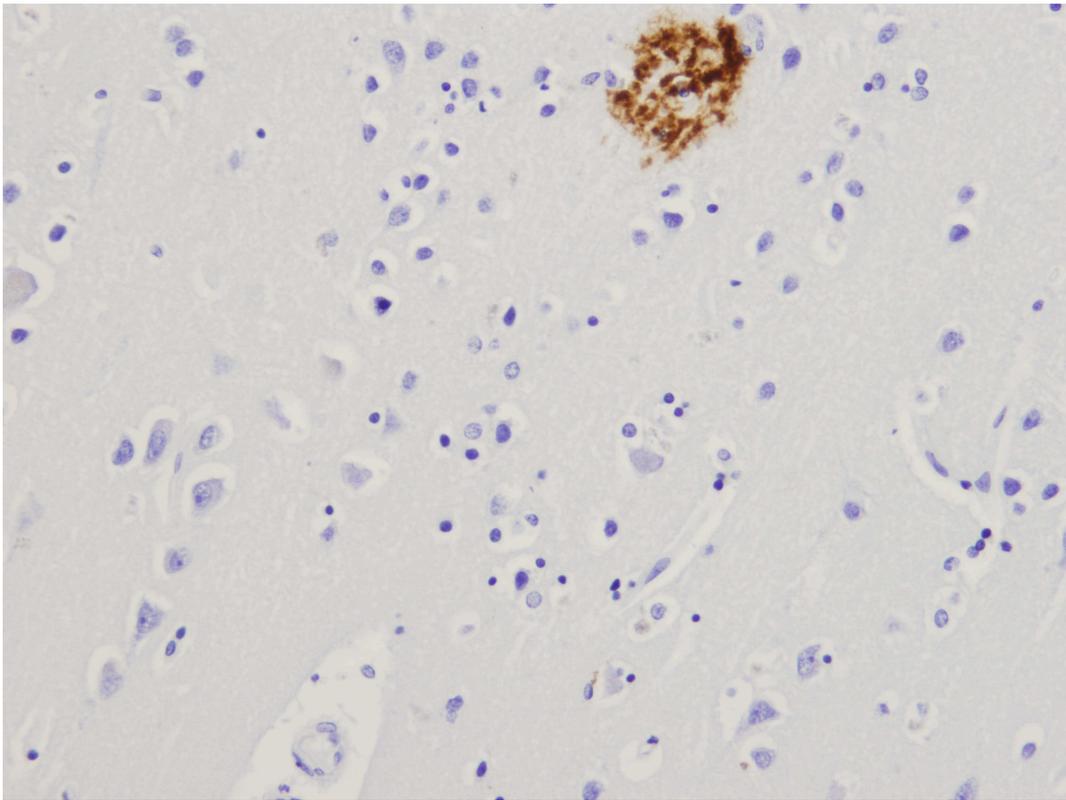
**Abbildungen 5.5a- 5.5e: Darstellung eines ChromograninA-, A $\beta$ - und Ubiquitin-positiven/ AT8-negativen Plaques aus dem Kollektiv der NDEP.**



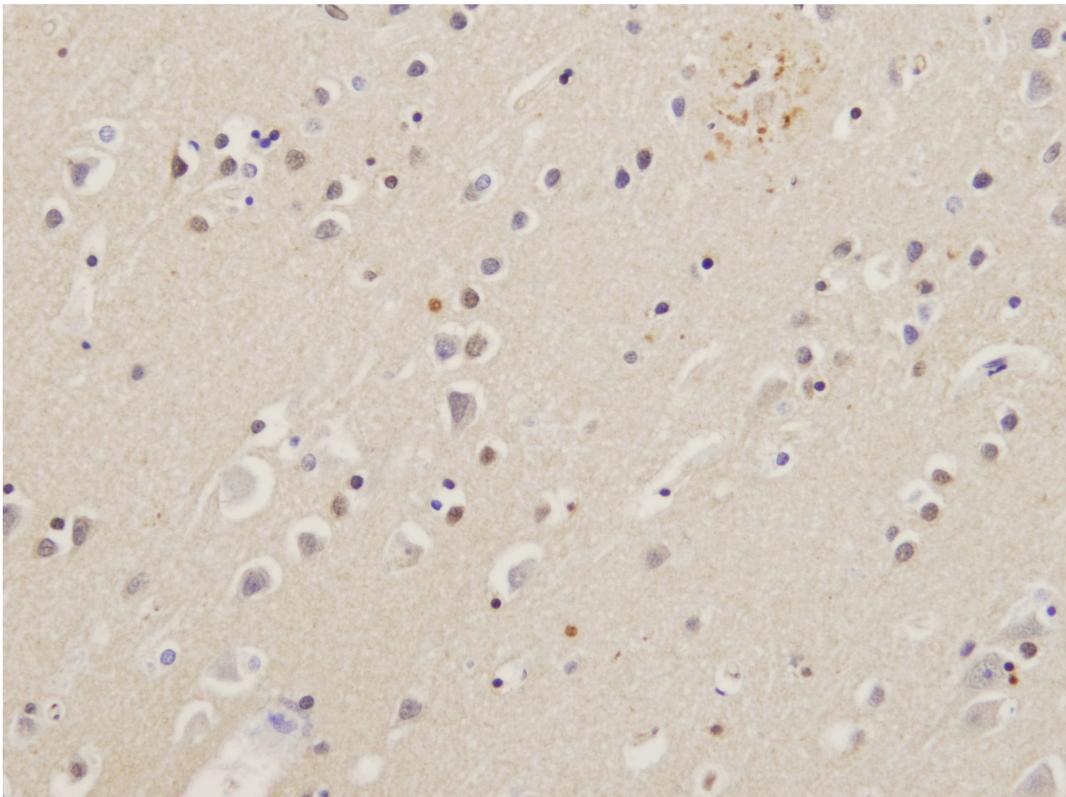
**Abbildung 5.6a: NDEP Tau-Protein AK**



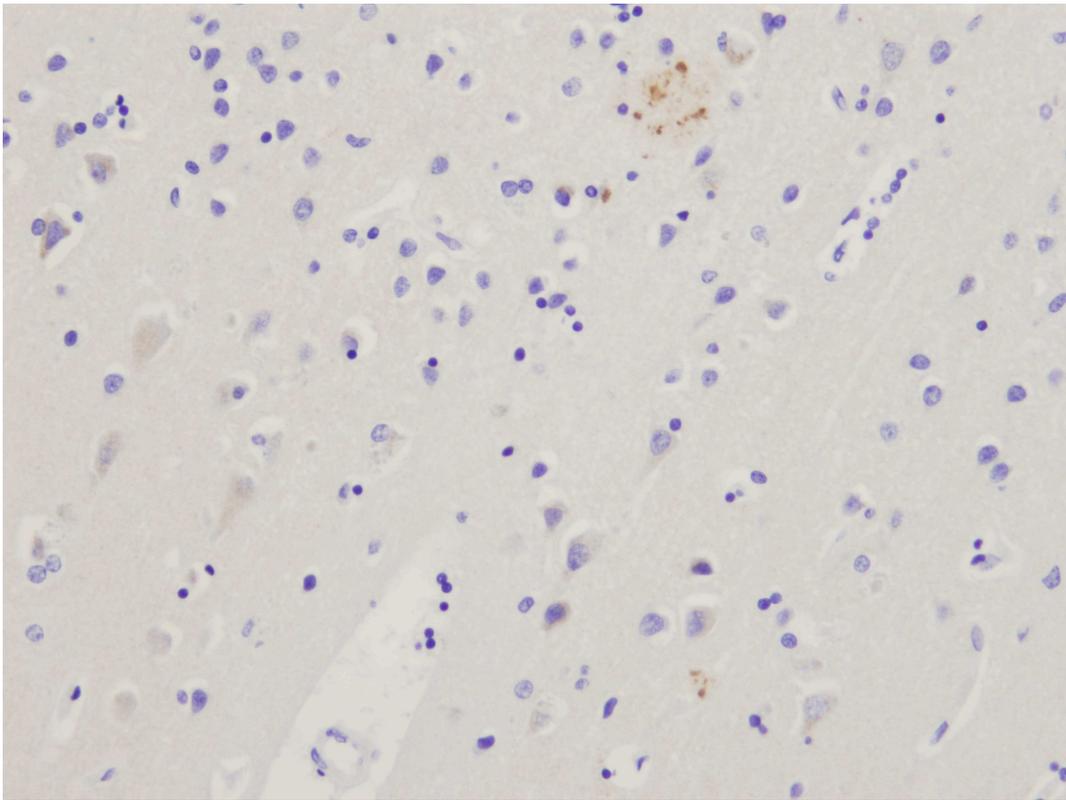
**Abbildung 5.6b: NDEP AT8 AK**



**Abbildung 5.6c: NDEP  $\beta$ -Amyloid AK**



**Abbildung 5.6d: NDEP Ubiquitin AK**



**Abbildung 5.6e: NDEP ChromograninA AK**

**Abbildungen 5.6a- 5.6e: Darstellung eines ChromograninA-, A $\beta$ - und Ubiquitin-positiven/ AT8-negativen Plaques aus dem Kollektiv der NDEP.**

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	(Strept-) Avidin-Biotin-Complex-Methode
AD	Alzheimer`s Disease
AGE	Advanced Glycation Endproducts
APH 1	Anterior Pharynx-Defective 1
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
BACE 1	$\beta$ -site APP-Clearing Enzyme 1
CA 1	Cornu ammonis 1
CERAD	Consotium to Establish a Registry for Alzheimer`s Disease
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
COX 2	Cyclooxygenase 2
DAB-Reaktion	3,3'- Diaminobenzidin Reaktion
DAT	Demenz vom Alzeimer-Typ
DGNN	Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie
DLB	Dementia with Lewybodyes
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Disorders
FAST	Functional Assessment Staging
FDG	Fluorodeoxyglucose
GDS	Global Deterioration Scale
HE	Hämatoxylin-Eosin
HOPS	Hirnorganisches Psychosyndrom
ICD	International Classification of Diseases
MAP	Microtubulus-Assoziiertes Protein
MCI	Mild Cognitive Impairment
MMSE	Mini-Mental State Examination
MRI	Magnet-Resonance-Imaging
NDEP	Non-Dement Elderly Person
NINCDS-ADRDA	National Institute of Neurological and Commmunicative Diseases and Stroke

	and the Alzheimer's Disease and related Disorders Association
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAR	Nicht-Steroidale-Anti-Rheumatica
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEN-2	Presenilin Enhancer 2
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PSEN 1/ 2	Presenilin-Gen 1/2
SP	Senile Plaque
T-Tau	Totales Tau

## 7 Literaturverzeichnis

- Adams L.A., Munoz D.G. (1993), Differential incorporation of processes derived from different classes of neurons into senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*; 86: 365-370
- Anderton B.H. (2002), Ageing of the brain. *Mech Ageing Dev.*; 123: 811-817
- Anderton B.H. (1997), Changes in the ageing brain in health and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; 352: 1781-1792
- Alzheimer A. (1907), Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*; 64: 146-148
- Areosa S.A., Sherriff F., McShane R. (2005) Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev.*; 2: CD003154
- Bard F., Cannon C., Barbour R., Burke R.L., Games D., Grajeda H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., Yednock T. (2000), Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med.*; 6: 961-19
- Blennow K. (2004) Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuro Rx.*; 1: 213-25
- Blennow K., Hampel H. (2003) CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*; 2: 605-13
- Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet*; 368: 387-403
- Blurton- Jones M., Laferla F.M. (2006) Pathways by which A $\beta$  facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res.*; 3(5): 437-448
- Boenisch T., Farmilo A.J., Stead R.H. (2003) Färbemethoden- Detektionssysteme. In: Boenisch T., Farmilo A.J., Stead R.H. *Immunchemische Färbemethoden 3.Aufl.*, DAKO Cytomation, Carpinteria USA; 34-42
- Bondi M.W., Salmon D.P., Butters N. (1994) Neuropsychological features of memory disorders in Alzheimer disease. In: *Alzheimer Disease*; 41-63. Terry R.D., Katzmann R., Bick K.L. (eds). Raven Press, New York 1994
- Bouras C., Hof P.R., Giannakopoulos P., Michel J.P., Morrison J.H. (1994) Regional Distribution of Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in the Cerebral Cortex of Elderly Patients: A Quantitative Evaluation of a One- Year Autopsy Population from a Geriatric Hospital. *Cerebral Cortex*; 2: 138-150
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* Oct; 112(4):389-404
- Braak H., Braak E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer- related changes. *Acta Neuropathol.*; 82: 239-259

- Braak H., Duyckaerts C., Braak E., Piette F. (1993) Neuropathological staging of Alzheimer related changes correlates with psychometrically assessed intellectual status, *Alzheimer's Disease. Advances in Clinical and Basic Research*; 131-137
- Braak E., Griffing K., Arai K., Bohl J., Bratzke H., Braak H. (1999) Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*; 249(3): 14-22
- Brion J.P., Couck A.M., Bruce M., Anderton B., Flament-Durand J. (1991) Synaptophysin and ChromograninA immunoreactivities in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res.*; 539: 143-150
- Bullock R., Dengiz A. (2005) Cognitive performance in patients with Alzheimer's disease receiving cholinesterase inhibitors for up to 5 years. *Int J Clin Pract.*; 59: 817-22
- Bullock R., Touchon J., Bergman H., Gambina G., He Y., Rapatz G., Nagel J., Lane R. (2005) Rivastigmine and Donepezil treatment in moderate to moderate-severe Alzheimer's disease over a 2-year period. *Curr Med Res Opin.*; 21: 1317-27
- Carson J.A., Turner A.J. (2002) Beta- amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metalloproteinases? *J Neurochem.*; 81: 1-8
- Chong M.S., Sahadevan S. (2005) Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *Lancet Neurol.*; 4: 576-79
- DAKO GmbH (2008) [www.dakogmbh.de](http://www.dakogmbh.de) 21.03.2008, 13:00h
- Davies C.A., Mann D.M.A. (1993) Is the 'preamyloid' of diffuse plaque in Alzheimer's disease really nonfibrillar? *Am J Pathol.*; 43: 1594-1605
- Dickson D.W. (1997) The pathogenesis of senile Plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 56: 321-339
- Dickson T.C., King C.E., McCormack G.H., Vickers J.C. (1999) Neurochemical Diversity of Dystrophic Neurites in the Early and Late Stages of Alzheimer's Disease. *Exp. Neurol.*; 1: 100-110
- Dimakopoulos A.C. (2005) Protein aggregation in Alzheimer's disease and other neuropathological disorders. *Curr Alzheimer Res.*; 2(1): 19-28
- Duyckaerts C., Delatour B., Potier M.C. (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.*; 118(1): 5-36
- Ellison D., Love S., Chimelli L., Harding B., Lowe J., Roberts G.W., Vinters H.V. (2004) Alzheimer's disease. In: Ellison D., Love S., Chimelli L., Harding B., Lowe J., Roberts G.W., Vinters H.V., *Neuropathology- A reference text of CNS pathology*. Mosby Elsevier; 550-565
- Eschbach D.A., da Silva K., Jünemann M., Kuchelmeister K. (2008) Alpha-synuclein-immunohistology and immunohistological findings of senile plaques in dementia with lewy bodies and Alzheimer's disease brains and brains of non-demented elderly persons. *Acta Neuropathol.*; 116: 339-357
- Esiri M.M., Hyman B.T., Beyreuther K., Masters C.L. (1997) Ageing and Dementia. Graham, D., Lantos, P.L. (Eds.), *Greenfield's Neuropathology*, London; 153-233
- Etcheberrigaray R., Tan M., Dewachter I., Kuiperi C., Van der Auwera I., Wera S., Qiao L., Bank B., Nelson T.J., Kozikowski A.P., Van Leuven F., Alkon D.L. (2004) Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 11141-46

- Farrer L.A., Cupples L.A., Haines J.L., Hyman B., Kukull W.A., Mayeux R., Myers R.H., Pericak-Vance M.A., Risch N., van Duijn C.M. (1997) Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: a meta-analysis. *JAMA*; 278: 1349-56
- Ferri C.P., Prince M., Brayne C., Brodaty H., Fratiglioni L., Ganguli M., Hall K., Hasegawa K., Hendrie H., Huang Y., Jorm A., Mathers C., Menezes P.R., Rimmer E., Sczufca M. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*; 366: 2112-17
- Gandy S. (2005) The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.*; 115: 1121-29
- Gauthier S., Reisberg B., Zaudig M., Petersen R.C., Ritchie K., Broich K., Belleville S., Brodaty H., Bennett D., Chertkow H., Cummings J.L., de Leon M., Feldman H., Ganguli M., Hampel H., Scheltens P., Tierney M.C., Whitehouse P., Winblad B. (2006) Mild Cognitive Impairment. *Lancet*; 367: 1262-70
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*; 349: 704-06
- Goedert M., Jakes R., Vanmechelen E. (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett.*; 189: 167-170
- Griffin W.S., Sheng J.G., Roberts G.W., Mrak R.E. (1995) Interleukin- 1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease significance in plaque evolution. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 54: 276-281
- Grundke- Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C., Quinlan M., Wisniewski H.M., Binder L.I. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule- associated protein  $\tau$  (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci.*; 83: 4913-17
- Hardy J., Selkoe D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*; 297: 353-56
- Harris G.J., Schlaepfer T.E., Peng L.W., Lee S., Federman E.B., Pearlson G.D. (1994) Magnetic resonance imaging evaluation of the effects of ageing on grey white ratio in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.*; 20: 290-293
- Harvey R.J., Skelton-Robinson M., Rossor M.N. (2003) The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psych.*; 74: 1206-09
- Henneman W.J., Sluimer J.D., Barnes J., van der Flier W.M., Sluimer I.C., Fox N.C., Scheltens P., Vrenken H., Barkhof F. (2009) Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease : added value over whole brain volume measures. *Neurology*; 72(11): 999-1007
- Holtzman D.M., Bales K.R., Tenkova T., Fagan A.M., Parsadanian M., Sartorius L.J., Mackey B., Olney J., McKeel D., Wozniak D., Paul S.M. (2000) Apolipoprotein E isoform- dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 2892-97
- Huang C.M., Shui H.A., Wu Y.T., Chu P.W., Lin K.G., Kao L.S., Chen S.T. (2001) Proteomic analysis of proteins in PC12 cells before and after treatment with nerve growth factor : increased levels of a 43- kDa chromogranin B- derived fragment during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res.*; 92: 181-192

- Huttunen H.J., Kuja- Panula J., Rauvala H. (2002) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling induces CREB- dependent chromogranin expression during neuronal differentiation. *J Biol Chem.*; 277: 38635-38646
- Iadecola C. (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.*; 5: 347-60
- 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) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochem Biophys Acta*; 1739: 198-210
- Jagust W. (2006) Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia. *Alzheimer's Dementia*; 2: 36-42
- Jellinger K.A. (2004) Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol.*; 17: 719-23
- Joachim C., Games D., Morris J., Ward P., Frenkel D., Selkoe D. (1991) Antibodies to non-beta regions of the beta-amyloid precursor protein detect a subset of senile plaques. *Am J Pathol.*; 138: 373-384
- Jünemann M., da Silva K., Eschbach D.A., Kuchelmeister K. (2008) Immunohistological profile of senile plaques in Alzheimer's disease brains and brains of non-demented elderly persons. *Acta Neuropathol*; 116: 339-357
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell- surface receptor. *Nature*; 325: 733-36
- Kim T., Tao-Cheng J.H., Eiden L.E., Loh Y.P. (2001) ChromograninA, an on/off switch controlling dense- core secretory granule biogenesis. *Cell*; 106: 499-509
- Kim T., Tao-Cheng J.H., Eiden L.E., Peng Loh Y. (2003) The role of ChromograninA and the control of secretory granule genesis and maturation. *Trends Endocrinol Metab.*; 14: 56-57
- Kromer A., Glombik M.M., Huttner W.B., Gerdes H.H. (1998) Essential role of the disulfide- bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *J Cell Biol.*; 140: 1331-1346
- Lassmann H., Weiler R., Fischer P., Bancher C., Jellinger K., Floor E., Danielczyk W., Seitelberger F., Winkler H. (1992) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: immunological data for markers of synaptic and large dense- core vesicles. *Neuroscience*; 46: 1-8
- Lechner T., Adlassnig C., Humpel C., Kaufmann W.A., Maier H., Reinstadler-Kramer K., Hinterhölzl J., Mahata S.K., Jellinger K.A., Marksteiner J. (2004) Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.*; 39: 101-113
- Levy-Lahad E., Wasco W., Poorkaj P., Romano D.M., Oshima J., Pettingell W.H., Yu C.E., Jondro P.D., Schmidt S.D., Wang K. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*; 269: 973-77
- Löffler G., Petrides P.E. (2003) *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer Verlag; 1068f
- Luo Y., Bolon B., Kahn S., Bennett B.D., Babu-Khan S., Denis P., Fan W., Kha H., Zhang J., Gong Y., Martin L., Louis J.C., Yan Q., Richards W.G., Citron M., Vassar

- R. (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta secretase, have normal phenotype and abolished beta- amyloid generation. *Nat Neurosci.*; 4: 231-32
- Mackenzie I.R. (1994) Senile plaques do not progressively accumulate with normal aging. *Acta Neuropathol.*; 87(5): 520-525
- Maho M.-K., Yasuo I. (2002) Alzheimer's Disease: Beta-Amyloid Protein and Tau. *J Neurosci Res.*; 70: 392-401
- Marksteiner J., Kaufmann W.A., Gurka P., Humpel C. (2002) Synaptic proteins in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.*; 18: 53-63
- Masterman D. (2003) Treatment of the neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *J Am Med Dir Assoc.*; 4(6): 146-54
- Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82: 4245-49
- Mayeux R. (2003) Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.*; 26: 81-104
- McKhann G., Drachmann D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS- ADRDA Work Group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*; 34: 939-44
- Morris J.C. (2006) Mild cognitive impairment is early- stage Alzheimer disease: time to revise diagnostic criteria. *Arch Neurol.*; 63: 15-6
- Morris J.C., Storandt M., McKeel D.W., Rubin E.H., Price J.L., Grant E.A., Berg L. (1996) Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology*; 46(3): 707-719
- Mortimer J.A., Snowdon D.A., Markesbery W.R. (2003) Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study. *J Clin Exp Neuropsychol.*; 25: 671-79
- Munoz D.G. (1991) ChromograninA- like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab Invest.*; 64(6): 826-32
- Nestor P.J., Scheltens P., Hodges J.R. (2004) Advances in early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med.*; 10: 34-41
- Nukina N., Ihara Y. (1986) One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem.*; 99: 1541-44
- Orgogozo J.M., Gilman S., Dartigues J.F., Laurent B., Puel M., Kirby L.C., Jouanny P., Dubois B., Eisner L., Flitman S., Michel B.F., Boada M., Frank A., Hock C. (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*; 61: 46-54
- Permanne B., Adessi C., Saborio G.P., Fraga S., Frossard M.J., Van Dorpe J., Dewachter I., Banks W.A., Van Leuven F., Soto C. (2002) Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta- sheet breaker peptide. *FASEB J.*; 16: 860-62
- Petersen R.C. (2004) Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med.*; 256: 183-94

- Petersen R.C., Smith G.E., Ivnik R.J., Kokmen E., Tangalos E. (1994) Memory funktion in very early Alzheimer's disease. *Neurol.*; 44: 867-872
- Poirier J. (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*; 17: 525-30
- Price J.L., Davis P.B., Morris J.C., White D.L. (1991) The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 12(4): 295-312
- Reisberg B., Ferris S.H., DeLeon M.J., Crook T. (1982) The global deterioration scale for assesment of primary degenerative dementia. *Am J Psych.*; 139: 1136-1139
- Reisberg B., Ferris S.H., Torossian C., Kluger A., Monteiro I. (1992) Pharmacologic treatment of Alzheimer's disease: A methodologic critique based upon current knowledge of symptomatology and relevance for drug trials. *Int Psychogeriatr.*; 4(1): 9-42
- Riekse R.G., Leverenz J.B., McCormick W., Bowen J.D., Teri L., Nochlin D., Simpson K., Eugenio C., Larson E.B., Tsuang D. (2004) Effect of vascular lesions on cognition in Alzheimer's disease: a community- based study. *J Am Geriatr Soc.*; 52: 1442-48
- Schmitt F.A., Davis D.G., Wekstein D.R., Smith C.D., Ashford J.W., Markesbery W.R. (2000) "Preclinical" AD revisited: Neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology*; 55: 370-376
- Shen P.J., Gundlach A.L. (1996) Chromogranin mRNA levels in the brain as a marker for acute and chronic changes in neuronal activity: affect of treatments including seizures, osmotic stimulation and axotomy in the rat. *Eur J Neurosci.*; 8: 988-1000
- Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Chi H., Lin C., Li G., Holman K. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early- onset familial Alzheimer's disease. *Nature*; 375: 754-60
- Siemers E., Skinner M., Dean R.A., Gonzales C., Satterwhite J., Farlow M., Ness D., May P.C. (2005) Safety, tolerability and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma- sekretase inhibitor in volunteers. *Clin Neuropharmacol.*; 28: 126-32
- Small D.H., Ismael Z., Chubb I.W. (1986) Acetylcholinesterase hydrolyses ChromograninA to yield low molecular weight peptides. *Neuroscience*; 19: 289-295
- Snowdon D.A. (1997) Aging and Alzheimer's disease: lessons from the Nun Study. *Gerontologist.*; 37(2): 150-6
- Snowdon D.A., Greiner L.H., Mortimer J.A., Riley K.P., Greiner P.A., Markesbery W.R. (1997) Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease: the Nun study. *JAMA*; 277: 813-17
- Su J.H., Cummings B.J., Cotman C.W. (1994) Subpopulations of dystrophic neurites [correction of neuritis] in Alzheimer's brain with distinct immunocytochemical and argentophilic characteristics. *Brain Res.*; 637(1-2): 37-44
- Su J.H., Cummings B.J., Corman C.W., (1996) Plaque biogenesis in brain ageing and Alzheimer's disease. Progressive changes in phosphorylation states of paired helical filaments and neurofilaments. *Brain Res.*; 739(1-2): 79-87

- Tago H., McGeer P.L., McGeer E.G. (1987) Acetylcholinesterase fibers and development of senile Plaques. *Brain Res.*; 406: 363-369
- Tariot P.N., Farlow M.R., Grossberg G.T., Graham S.M., McDonald S., Gergel I. (2004) Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA*; 291: 317-24
- Terry A.V. Jr., Buccafusco J.J. (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease- related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.*; 306: 821-827
- Terry R.D., Wisniewski H.M. (1970) The ultrastructure of the neurofibrillarytangle and the senile plaque. Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds) *Alzheimer's disease and related conditions*. J & A Churchill, London; 145-168
- Terry R.D., Wisniewski H.M. (1972) Ultrastructure of senile dementia and of experimental analogs. Gaitz CM (ed) *Aging and the brain*. Plenum, New York; 89-116
- Thal D.R., Braak H. (2005) Postmortale Diagnosestellung beim Morbus Alzheimer. *Pathologe*; 26: 201-213
- Thal D.R., Hartig W., Schober R. (1998) Stage-correlated distribution of type 1 and 2 dystrophic neurites in cortical and hippocampal plaques in Alzheimer's disease. *J Brain Res.*; 39: 175-181
- Thal D.R., Rüb U., Schultz C., Sassin I., Ghebremedhin E., Del Tredici K., Braak E., Braak H. (2000) Sequence of Abeta deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 59: 733-758
- Tyas S.L., Snowdon D.A., Desrosiers M.F., Riley K.P., Markesbery W.R. (2007) Healthy ageing in the Nun Study: definition and neuropathologic correlates. *Age Ageing.*; 36(6): 650-5
- Vassar R., Bennett B.D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E.A., Denis P., Teplow D.B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jarosinski M.A., Biere A.L., Curran E., Burgess T., Louis J.C., Collins F., Treanor J., Rogers G., Citron M. (1999) Beta- secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*; 286: 735-41
- Vickers J.C., Chin D., Edwards A.M., Sampson V., Harper C., Morrison J. (1996) Dystrophic neurite formation associated with age related  $\beta$ - amyloid deposition in the neocortex: clues to the genesis of neurofibrillary pathology. *Exp Neurol.*; 141: 1-11
- Wang D., Munoz D.G.(1995) Qualitative and quantitative differences in senile plaque dystrophic neurites of Alzheimer's disease and normal aged brain. *J Neuropathol Exp Neurol.*; 54(4): 548-56
- Wilcock G.K. (2003) Memantine for the treatment of dementia. *Lancet Neurol.*; 2: 503-05
- Yaari R., Corey-Bloom J. (2007) Alzheimer's disease. *Semin Neurol.*; 27: 32-41
- Yashura O., Kawamata T., Aimi Y., McGeer E.G., McGeer P.L. (1994) Expression of ChromograninA in lesions in the central nervous system from patients with neurological diseases. *Neurosci Lett.*; 170: 13-16

- Yashura O., Kawamata T., Aimi Y., McGeer E.G., McGeer P.L. (1994) Two types of dystrophic neurites in senile plaques of Alzheimer disease and elderly non-demented cases. *Neurosci Lett.*; 171: 73-76
- Yoo S.H., You S.H., Kang M.K., Huh Y.H., Shim C.S. (2002) Lokalisation of the secretory granule marker protein chromogranin B in the nucleus. Potential role in transcription control. *J Biol Chem.*; 277: 16011-16021

## 8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Martin Jünemann

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denen danken, die maßgeblich zu der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Prof Dr. med. K. Kuchelmeister für die Möglichkeit der Promotion, die Überlassung dieses Themas, sowie die jederzeit gewährte engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Rötering für die praktische Einarbeitung in die Immunhistologie, Frau Leib und Frau Schmidt für die Hilfe bei der Vorbereitung der verwendeten Schnitte, Herrn Hudez, sowie allen weiteren Mitarbeitern des Neuropathologischen Instituts in Gießen, die stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Insbesondere danke ich auch meiner Familie und Freunden für die langjährige Unterstützung.