

# **Immunhistologische Charakteristika seniler Plaques unter besonderer Berücksichtigung der Alpha-Synuklein- Immunhistologie**

Eine vergleichende neuropathologische Autopsiestudie bei M. Alzheimer, Demenz  
mit Lewy-Körpern und nicht-dementen alten Menschen

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

vorgelegt von  
Daphne-Asimonia Eschbach  
aus Mainz

Giessen 2010

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

1. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Kuchelmeister
  2. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Acker
- Tag der Disputation: 19.08.2010

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Alpha-Synuklein ( $\alpha$ -Synuklein) .....	5
1.1.1	Vorkommen und Funktion .....	5
1.1.2	$\alpha$ -Synukleinopathien .....	6
1.2	Plauepathologie bei DLB .....	8
1.3	Plauepathologie bei DAT .....	10
1.4	Morphologische Charakteristika des alternden Gehirns .....	14
1.5	Fragestellung .....	16
2	Material und Methode .....	17
2.1	Patientenkollektiv .....	17
2.2	Gewebeproben .....	18
2.3	Immunhistologie .....	19
2.3.1	Durchföhrung der immunhistologischen Untersuchungen .....	21
2.4	Befundauswertung .....	22
2.4.1	Bestimmung der Plaueedichte .....	22
2.4.2	Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein .....	23
2.4.3	Immunreaktivität ChromograninA positiver Plaues .....	23
2.4.4	Immunreaktivität AT8- positiver Plaues .....	24
3	Ergebnisse .....	25
3.1	Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein .....	25
3.1.1	Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein bei DAT Fällen .....	25
3.1.2	Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein bei DLB Fällen .....	26
3.1.3	Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein bei Fällen der Kontrollgruppe .....	26
3.2	Dichte immunreaktiver seniler Plaues .....	27
3.2.1	Dichte immunreaktiver seniler Plaues bei DAT-Fällen .....	27
3.2.2	Dichte immunreaktiver seniler Plaues bei DLB -Fällen .....	32
3.2.3	Dichte immunreaktiver seniler Plaues bei Fällen der Kontrollgruppe .....	36
3.3	Vergleichende immunhistologische Untersuchungen von senilen Plaues bei DLB Fällen .....	40
3.3.1	Immunreaktivität AT-8-positiver seniler Plaues bei DLB Fällen .....	40
3.3.2	Immunreaktivität ChromograninA-positiver seniler Plaues bei DLB Fällen .....	41

3.4	Immunhistochemische Untersuchungen von senilen Plaques bei Fällen der Kontrollgruppe .....	42
3.4.1	Immunreaktivität AT8-positiver seniler Plaques bei Fällen der Kontrollgruppe.....	42
3.4.2	Immunreaktivität ChromograninA positiver seniler Plaques bei Fällen der Kontrollgruppe.....	44
4	Diskussion.....	45
4.1	Material und Methodendiskussion.....	45
4.1.1	Begründung für die Wahl der Antikörper.....	45
4.1.2	Verfahren der Auswertung .....	47
4.2	Interpretation des Ergebnisses .....	47
4.3	Zusammenfassung.....	62
4.4	Abstract.....	64
5	Anhang.....	66
5.1	Fallkollektiv DAT .....	66
5.2	Fallkollektiv DLB.....	68
5.3	Fallkollektiv Kontrollgruppe .....	69
5.4	Untersuchte Paraffinblöcke .....	69
5.5	Bilder.....	72
6	Abkürzungsverzeichnis .....	92
7	Literaturverzeichnis .....	93
8	Eidesstattliche Erklärung.....	100
9	Danksagung .....	101

# 1 Einleitung

## 1.1 Alpha-Synuklein ( $\alpha$ -Synuklein)

### 1.1.1 Vorkommen und Funktion

Bei den Synukleinen handelt es sich um eine Familie neuraler Proteine, deren Funktion bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt ist. Im menschlichen Gehirn existieren drei verschiedene Synukleine,  $\alpha$ -Synuklein,  $\beta$ -Synuklein und  $\gamma$ -Synuklein. Diese drei Synukleinproteine werden von drei unterschiedlichen Genen kodiert, die Länge ihrer Aminosäuresequenzen variiert von 112 Aminosäuren bis 140 Aminosäuren, wobei die Sequenzen zu zwischen 55-62% übereinstimmen [Goedert et al. 2001].

Immunhistochemisch konnten Synukleine in geringer Konzentration in Nervenzellkörpern und Dendriten, sowie in größerer Konzentration in Nervenzellenendigungen nachgewiesen werden [Jakes et al. 1994].

Elektronenmikroskopisch wurden Synukleine ebenfalls in Nervenendigungen, insbesondere in der Nähe von synaptischen Vesikeln gefunden [Clayton et George 1999]. Synukleine spielen dort wahrscheinlich eine Rolle bei der Organisation der Vesikel und dem Transmissionsvorgang an der Synapse [Beyer et al. 2004].

$\alpha$ -Synuklein existiert im menschlichen Gehirn in mindestens drei Isoformen, die durch alternatives Spleißen aus dem  $\alpha$ -Synuklein-Gen hervorgehen. Die komplette Isoform vereint 140 Aminosäuren, während die anderen beiden Formen über 126 bzw. 112 Aminosäuren verfügen [Beyer 2006].

Die  $\alpha$ -Synuklein-112 Isoform ist die gehirnspezifische Isoform, während  $\alpha$ -Synuklein-140 auch in anderen Geweben wie Muskel, Herz oder Pankreas zu finden ist [Uéda et al. 1994].

$\alpha$ -Synuklein ist ein dynamisches Protein, es passt seine Sekundärstruktur seiner jeweiligen Umgebung an. So liegt es beispielsweise in einer wässrigen Lösung ungefalt und zufällig gedreht vor, während es gebunden an saure Phospholipidvesikel

eine  $\alpha$ -Helix ausbildet. In einer weiteren Variante kann es als unlösliche fibrilläre Struktur mit hohem Anteil an  $\beta$ -Faltblatt Strukturen repräsentiert sein [Beyer et al. 2004].

Die Auswertung von Expressionsprofilen transgener Fliegen zeigte, dass die Expression von Lipid- und Membrantransport Proteinen assoziiert war mit der Expression von  $\alpha$ -Synuklein [Scherzer et al. 2003].

Weitere Studien zeigten, dass sowohl die Überexpression von  $\alpha$ -Synuklein in neuronalen Zelllinien, als auch die homozygote Deletion des  $\alpha$ -Synuklein Gens in Mäusen zu signifikanten Änderungen in der zellulären Aufnahme und intrazellulären Verstoffwechselung von Fettsäuren, sowie zu einer Beeinflussung der Membranfluidität führt [Castagnet et al. 2005, Golovko et al. 2005, Sharon et al. 2003].

Basierend auf Forschungen zur Interaktion von  $\alpha$ -Synuklein mit zytoplasmatischen Strukturen wie z. B. dem Golgi Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum konnte eine weitere Funktion von  $\alpha$ -Synuklein in vivo entschlüsselt werden.  $\alpha$ -Synuklein scheint in der Interaktion mit weiteren Proteinen, wie beispielsweise dem CSP $\alpha$  (cystein-string alpha Protein), einem Protein der synaptischen Vesikel mit co-Chaperone Funktion, eine neuroprotektive Wirkung zu haben [Bonini et Giasson 2005, Chandra et al. 2005].

Inaktivierung des  $\alpha$ -Synuklein Gens mittels homologer Rekombination scheint zu einer gesteigerten Freisetzung von Dopamin zu führen. Demzufolge könnte eine weitere Funktionen von  $\alpha$ -Synuklein die Beteiligung an einer aktivitätsabhängigen negativen Regulation der Neurotransmission sein [Abeliovich et al. 2000, Buchmann et al. 1998].

### **1.1.2 $\alpha$ -Synukleinopathien**

Als  $\alpha$ -Synukleinopathien werden Proteinopathien des Gehirnes zusammengefasst, die intrazelluläre Einschlusskörper mit  $\alpha$ -Synuklein als Hauptkomponente aufweisen [Uversky 2007].

Die Bezeichnung  $\alpha$ -Synukleinopathie wurde eingeführt, als ersichtlich wurde, dass filamentöse Aggregate von  $\alpha$ -Synuklein in Nervenzellen und Gliazellen möglicherweise eine Verbindung zwischen dem Morbus Parkinson (PD), der Multisystematrophie und der Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) darstellen

[Jellinger 2003, Spillantini et al. 1998]. Zu den der Alphasynukleinopathien werden überdies noch gezählt: Das Hallervorden-Spatz Syndrom (Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn), die reine autonome Dysfunktion (pure autonomic failure), sowie in einigen Quellen noch die Amyotrophe Lateralsklerose, sowie die Chorea Huntington [Charles et al. 2000, Furlong et al. 2000, Galvin et al. 2001, Uversky 2007].

Die  $\alpha$ -Synuklein Aggregationen können sowohl in dopaminergen, als auch in nicht dopaminergen Neuronen und in Gliazellen vorliegen. Die wichtigsten Strukturen mit  $\alpha$ -Synukleinablagerungen sind Lewy Körperchen [Forno 1996], Lewy Neuriten [Braak et al. 1994, 1999, Dickson et al. 1991], Gliale Zytoplasmatische Einschlüsse (Glial cytoplasmic inclusions, GCIs) [Papp et al. 1989] und Neuronale Zytoplasmatische Einschlüsse (Neuronal cytoplasmic inclusions, NCIs) [Arima et al 1998, Nishie et al. 2004]

Lewy-Körperchen sind das morphologische Hauptcharakteristikum der Parkinson Erkrankung, aber auch bei der DLB zu finden. GCI`s und NCI`s finden sich vor allem bei der Multisystematrophie [Gai et al. 1998].

Des Weiteren gibt es Hinweise, dass in Alzheimer typischen Plaques, abgesehen von  $\beta$ -Amyloid, der Hauptkomponente von Alzheimer typischen Plaques, eine weitere, so genannte Non-amyloid Komponente (NAC) nachgewiesen werden konnte. Es existieren Studien, die in dieser NAC eine  $\alpha$ -Synuklein positive Komponente vermuten, ein Peptid aus der zentralen, hydrophoben Region (61-95) des  $\alpha$ -Synukleins [Uéda et al. 1993, Han et al. 1995]. Diesbezüglich ist die Literatur jedoch uneinheitlich.

Alzheimer assoziierte Plauepathologie findet sich andererseits regelmäßig in DLB Sektionsgut. Allerdings ist man sich nicht einig, ob es sich dabei um eine Koexistenz von zwei unterschiedlichen Krankheiten, um eine eigenständige Krankheit oder um eine Variante des Morbus Alzheimer handelt.

## 1.2 Plauepathologie bei DLB

Die Geschichte der Lewy Körperchen assoziierten Erkrankungen begann etwa 1912, dem Jahr, in welchem Friedrich Lewy zum ersten Mal intrazytoplasmatische Einschlüsse in der „substantia innominata“ bei Parkinsonpatienten nachweisen konnte. 1923 veröffentlichte er eine Abhandlung über neurologische, psychiatrische und neuropathologische Daten von 43 Parkinson Patienten. Aus diesem Kollektiv konnte bei 21 Patienten zusätzlich auch eine Demenz beobachtet werden. Eine Verbindung zwischen der Demenz und dem Vorhandensein von Lewy Körperchen wurde im weiteren Verlauf 1938 von Hassler und 1962 von Woodard bestätigt. Letzterer berichtete über eine Reihe von psychiatrischen Patienten, bei denen autoptisch im Gehirn Lewy-Körperchen nachgewiesen wurden. Er führte den Begriff der „Lewy Körperchen Krankheit“ ein.

Um 1970 prägten japanische Neuropathologen um Kosaka den Begriff der diffusen Lewy Körperchen Erkrankung mit einem kortikalen Subtyp und einem Hirnstamm Typ [Perry et al. 1996]. Von 1980 an befassten sich unterschiedliche Gruppen mit der weiteren Erforschung, Perry et al. berichteten 1990, dass in ihrem Patientengut in Newcastle Fälle der Lewy Körperchen Erkrankung die zweithäufigste Entität der Demenzen nach der Demenz vom Alzheimer Typ ist. In San Diego wurden bei 20% der Alzheimer Fälle Lewy Körperchen im Sektionsmaterial gefunden. Bis heute ist die Terminologie extrem inhomogen, so existieren zahlreiche Bezeichnungen für die Demenz mit Lewy Körperchen: AD mit Parkinson Krankheit, Lewy-body Variante der DAT, diffuse Lewy Körperchen Erkrankung, senile Demenz vom Lewy Körperchen Typ, usw. [Perry et al. 1996, Rosenberg et al. 2001].

1996 wurde in Newcastle im Rahmen einer Konsensus Konferenz der Terminus „Demenz mit Lewy Körperchen (DLB)“ festgelegt. Es wurden klinische Diagnosekriterien für die DLB entwickelt, die endgültige Diagnose ist jedoch erst postmortal neuropathologisch möglich. Diese Kriterien werden ständig dem Stand der Forschung angepasst, die letzte Überarbeitung erfolgte 2005 [McKeath et al. 2005].

Für die DLB charakteristisch sind, wie oben bereits angedeutet, Lewy Neuriten und Lewy Körperchen im limbischen System und ausgewählten neokortikalen Arealen [Deramecourt et al. 2006]. Lewy Neuriten sind  $\alpha$ -Synuklein positive Strukturen in Axonen und Dendriten. Lewy Körperchen sind im Zytoplasma von

Neuronen zu findende Einschlusskörperchen, deren Hauptkomponente das fibrilläre  $\alpha$ -Synuklein ist.

Es werden drei neuropathologische Subtypen der DLB unterschieden [McKeath et al. 2005]. Der hirnstamm-prädominante Subtyp, der limbische Subtyp und der neokortikale Subtyp. Die Unterteilung erfolgt zunächst topographisch. Man unterscheidet innerhalb des Hirnstammes die Kerngebiete des neunten und zehnten Hirnnerven, N. Glossopharyngeus und N. Vagus, den Locus Coeruleus sowie die Substantia nigra. Im Bereich des basalen Frontalhirnes und des limbischen Systems betrachtet man den N. basalis Meynert, die Regio Transentorhinalis, die Amygdala und den Gyrus Cinguli. Der Neokortex schließlich wird durch jeweils eine temporale, frontale und parietale Region repräsentiert.

Daran anschließend erfolgt eine semiquantitative Einschätzung des Ausmaßes an vorhandenen Lewy Körperchen. Zur Differenzierung werden die Abstufungen keine, mäßige, mittelgradige, massive und sehr schwere Ausprägung verwendet (*non, mild, moderate, severe, very severe*). Der einzuschätzende Bereich ist definiert durch die Größe eines lichtmikroskopischen Gesichtsfeldes bei geringer Vergrößerung („low power field“) [McKeath et al. 2005].

In etwa 70% der DLB Fälle kann in Gehirnen von DLB Patienten zusätzlich eine begleitende DAT Pathologie mit Plaques und Tangles nachgewiesen werden [Hansen et al. 1997]. Das Ausmaß dieser Alzheimer-Pathologie variiert laut Studienlage stark. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Bedeutung nicht geklärt. Es existiert ein reger Disput über die Zusammenhänge zwischen der DLB und der DAT.

Die gebräuchliche Quantifizierung der Plauepathologie bei der DAT ist das CERAD Protokoll (siehe 1.3). Eine Arbeitsgruppe des National Institute of Aging (NIA) entwickelte anhand dieser Einteilung unter Einschluss der topographischen Stadien der Tanglepathologie nach BRAAK die NIA-Reagan Kriterien: Dazu werden drei Stadien unterschieden, NIA low /Braak 0-II, NIA intermediate/ Braak III-IV und NIA high/ Braak V-VI [Hyman et al. 1997]. Klassifiziert man die DAT-Pathologie bei den einzelnen DLB Subtypen nach diesen Kriterien so hat sich gezeigt, dass sich, bei der hirnstamm-prädominanten Subform der DLB nur gering ausgeprägte DAT Pathologie nachweisen lässt, während sich bei der limbischen Form zumindest die niedrigen NIA/Braak Stadien häufig finden, die mittleren NIA/Braak Stadien mittelhäufig, und die hohen NIA/Braak Stadien selten. Bei der neokortikalen Form der DLB lässt sich die größte Menge an DAT Pathologie mit häufigen NIA/Braak Stadien

der ersten und zweiten Kategorie und mittlerem Vorkommen von Pathologie des dritten NIA/Braak Stadiums nachweisen [McKeath et al. 2005].

### 1.3 Plaquepathologie bei DAT

Die Demenz vom Alzheimer-Typ ist die häufigste Ursache einer dementiellen Erkrankung unserer Zeit und macht 50-60% aller Fälle aus. Ihre Prävalenz liegt bei unter 1% bei den 60-64-jährigen, steigt jedoch mit zunehmendem Alter sprunghaft an. Somit beträgt die Gesamtprävalenz der Demenz in der Altersgruppe der 85 und älteren schon zwischen 24% und 33%. Diese Zahlen gelten für die westliche Welt [Ferri et al. 2005]. Der Name der Erkrankung geht auf Alois Alzheimer zurück, der 1907 erstmals einen Fall mit „Minderung intellektueller Fähigkeiten, histologisch auffälligen Plaquestrukturen und fadenartigen Strukturen“ beschrieb [Alzheimer 1907].

Makroskopisch zeigt sich bei der Alzheimer-Demenz eine umschriebene cerebrale Atrophie mit geschrumpften Gyri und geweiteten Sulci, erweiterten Ventrikeln und einer Verschmälerung der kortikalen Rindenstruktur. In einem Großteil der Fälle ist das gesamte Gehirn davon betroffen, lediglich der Okzipitalpol ist in einigen Fällen von diesen Veränderungen ausgespart [Braak und Braak 1991, Duyckaerts 2009, Yaari et al. 2007].

Mikroskopisch imponieren als charakteristische Läsionen vor allem extrazelluläre Plaques, sowie neurofibrilläre Tangles (Alzheimersche Neurofibrillenveränderungen) in medio-temporalen und kortikalen Regionen des Gehirns, verbunden mit einer deutlichen neuronalen Degeneration und einem Verlust von Synapsen. Diese Plaques bestehen größtenteils aus  $\beta$ -Amyloid und werden als senile Plaques bezeichnet [Morishima-Kawashima et al. 2002]. Entgegen erster Annahmen, die lauteten, dass A $\beta$  ein abnormales Protein sei, ist heute gesichert, dass es im regelrechten Zellmetabolismus produziert wird [Haass et al. 1992]. Die zentrale Hypothese für die Entstehung der Demenz vom Alzheimer-Typ ist die so genannte Amyloid-Kaskaden-Hypothese: Diese geht von einer Störung des normalerweise vorhandenen Gleichgewichtes zwischen Produktion und Beseitigung des  $\beta$ -Amyloids aus. Dieses Ungleichgewicht scheint unausweichlich zur Degeneration von Neuronen und zur Demenz zu führen [Hardy et al. 2002]. Abgesehen von  $\beta$ -Amyloid

findet sich jedoch auch regelmäßig eine Immunreaktivität für Ubiquitin [Dimakopoulos 2005].

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren kleines Polypeptid, das in nahezu allen eukaryoten Zellen vorkommt. Ubiquitin spielt eine wichtige Rolle bei der Markierung von zum Abbau im Proteasom bestimmten Proteinen. Ubiquitiniert werden Polypeptide, welche im endoplasmatischen Retikulum nicht korrekt gefaltet werden konnten [Löffler et Petrides 2003]. Es wird vermutet, dass diesem Ubiquitin-Proteasom-System eine fundamentale Rolle in dem Prozess bei der Neurodegeneration zukommt [Dimakopoulos 2005]. Immunhistologische Untersuchungen beschreiben das Vorkommen von intrazellulären, filamentösen, ubiquitinierten Einschlüssen bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, unter anderem auch bei Morbus Alzheimer [Dimakopoulos 2005].

Neurofibrilläre Tangles sind molekular gesehen hauptsächlich Aggregationen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein [Grundke et al. 1986, Kondo et al. 1988, Nukina et Ihara 1986, Wischik et al. 1988].

Grundsätzlich unterscheidet man verschiedene morphologische Formen von senilen Plaques: Da sind zunächst die diffusen Plaques, welche nur zum Teil Amyloid enthalten, keinen zentralen Kern (core) besitzen und eher unscharf begrenzt sind. Allerdings existieren verschiedene Definitionen des Begriffs „diffuser Plaque“, wir richten uns hier nach der Definition von Yaari und Corey-Bloom [Yaari et Corey-Bloom 2007].

Weiterhin finden sich klassische Plaques, extrazelluläre sphärische Strukturen, die aus einem zentral gelegenen Kern aus Amyloid bestehen, der umrandet wird von degenerierten oder dystrophen Neuriten, sowie burned-out oder dense core Plaques, die nahezu ausschließlich aus einem kondensierten Amyloidkern bestehen [Ellison et al. 2004, Probst et al. 1991, Yaari und Corey-Bloom 2007]. Die Bezeichnung neuritischer Plaque in „Ellison et al. 2004“ beschreibt die Plaquekonstellation  $\beta$ -Amyloid core in Verbindung mit einem Randwall dystropher Neuriten.

Bezüglich der Einteilung der senilen Plaques ist die Literatur sehr uneinheitlich. Man vermutet, dass den verschiedenen Plaquearten ein Stadienverlauf zugrunde liegt. In der zeitlichen Abfolge wäre dann ein Progress von diffus über klassisch und dann zum ‚burned-out Plaque‘ anzunehmen. Diese Theorie kann bis heute jedoch noch nicht direkt bewiesen werden [Ellison et al. 2004].

Neuropathologisch wird das Ausmaß der Plaque-Pathologie mithilfe des so genannten CERAD-Protokolls quantifiziert. 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. Das Gehirn wird, gemäß dem CERAD-Protokoll, nach der makroskopischen Begutachtung mikroskopisch in mindestens sechs histologischen Schnitten aus verschiedenen Gehirnregionen untersucht. Damals wurde empfohlen die Paraffinschnitte mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, der Versilberung nach Bielschowsky und eventuell auch mit Thioflavin-S und Kongorot zu färben. Dabei erfolgt durch den Vergleich mit normierten Photographien bestimmter Plaquedichten die Einordnung in die Gruppen ‚keine Plaques‘, ‚wenig‘, ‚moderat‘, ‚häufig‘. Unter Berücksichtigung des Alters der Verstorbenen wird ein vierstufiger Score ermittelt. Bei Score 0 liegen hinsichtlich neuritischer Plaques keine Hinweise auf eine DAT vor. Bei Score A ist die DAT-Diagnose sehr unsicher. Score B legt die Diagnose einer DAT nahe und Score C lässt sie wahrscheinlich werden. Über eine Tabelle, die das Alter des Verstorbenen berücksichtigt, erfolgt die Einteilung in vier Gruppen („age-related plaque score“): Gruppe O zeigt keine 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 lässt sie Wahrscheinlich werden [Ellison et al. 2004].

Die Ausprägung der neurofibrillären Tangles wird üblicherweise nach Braak quantifiziert. Im Jahre 1991 veröffentlichten Braak und Braak eine Stadieneinteilung der Tangle-Pathologie [Braak und Braak 1991, Braak et al. 2006] und setzten diese mit den klinischen Symptomen in Beziehung [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 (Transenthorinale 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.

Bei den meisten DAT-Gehirnen ist auch eine  $\beta$ - Amyloidangiopathie nachzuweisen. Die Ursache einer cerebralen  $\beta$ -Amyloidangiopathie ist unbekannt, allerdings bestehen Ähnlichkeiten in der Verteilung der senilen Plaques und der  $\beta$ -Amyloidangiopathie, welche den Schluss nahe legen, dass vaskuläre Faktoren bei

der Plaqueentstehung eine Rolle spielen könnten [Armstrong et al. 1995, Effenbein et al. 2007, Farkas et Luiten 2001, Revesz et al. 2003, Vinters et al. 1986].

## 1.4 Morphologische Charakteristika des alternden Gehirns

Auch Gehirne von älteren Patienten, die keine kognitiven Veränderungen im Sinne einer Demenz vom Alzheimer-Typ aufweisen, zeigen altersbedingte Veränderungen. Makroskopisch imponiert meist eine allgemeine Gehirnatrophie, vor allem in Regionen des Frontallappens und des Hippokampus. Verbunden sind diese Substanzverluste mit einer Verschmälerung der Gyri, einer Abflachung des Sulcusreliefs und einer Erweiterung des Ventrikelsystems. Diese Veränderungen werden zumeist nach dem fünfzigsten Lebensjahr deutlich mit einem fortschreitenden cerebralen Gewichtsverlust von 2-3% pro Dekade, wobei sowohl die weiße als auch die graue Substanz betroffen sind [Anderton 1997]. Studien konnten allerdings mit Hilfe der Magnetresonanztomographie nachweisen, dass sich das Verhältnis von grauer zu weißer Substanz während des Alterungsprozesses verändert: So besteht ab einem Alter von fünfzig Jahren ein relativ größerer Verlust von weißer Substanz [Harris et al. 1994]. Genaue Schätzungen der Nervenzellverluste sind hier offenkundig schwer zu realisieren, zumal sogar diskutiert wird, ob es sich hierbei nicht um einen Verlust, sondern um ein Schrumpfen von Neuronen handelt [Esiri et al. 1997].

Neben den makroskopischen Veränderungen des alternden Gehirns zeigen sich auch eine Reihe von histologischen Befunden, von denen einige auch eine entscheidende Rolle im Rahmen der neuropathologischen Diagnostik des Morbus Alzheimer 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 [Bouras et al. 1994].

Es konnten Tangles in nahezu allen untersuchten Fällen eines Kollektives aus mittelalten bis alten Patienten nachgewiesen werden, ihre Dichte war im Vergleich zu DAT Gehirnen eher gering und ihre Ausdehnung vor allem auf Hippokampus, Amygdala und die transentorhinale Region beschränkt [Anderton 2002].

Studien zeigten, dass auch ein mittelschwerer Befall mit neurofibrillären Tangles des entorhinalen Kortex und des CA1 Feldes des Hippokampus durchaus mit einem normalen kognitiven Status einhergehen kann. Schwerwiegende pathologische Veränderungen im inferioren temporalen Neokortex bezogen auf neurofibrilläre Tangles

wurden nur bei dementen Patienten beobachtet, was den Schluss nahe legte, 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 neuritische Plaquestrukturen identifizieren, aber auch diese sind, ebenso wie die Tangles, im Vergleich zum Morbus Alzheimer von wesentlich geringerer Zahl [Anderton 2002]. Arbeiten wiesen bei solchen Patientenkollektiven vor allem neokortikale Plaques nach [Schmitt et al. 2000]. Es hat sich gezeigt, dass beim physiologischen Alterungsprozess die senilen Plaques 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 Art der Plaques 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 [Wang et Munoz 1995].

ChromograninA ist ein Protein-Prohormon 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. Sowohl ChromograninA als auch ChromograninB spielen eine essentielle Rolle bei der Sortierung und Zusammenlagerung potentieller vesikulärer Matrixproteine zu den unreifen, sekretorischen Vesikeln des regulierten sekretorischen Weges [Yoo et al. 2002]. Chromogranine scheinen darüber hinaus grundlegend die Differenzierung einer Zelle zu einer Zelle vom sekretorischen Phänotyp mitzubestimmen [Kim et al. 2001, 2003].

Diese Konstellation von Plaques die positiv für die Antikörper ChromograninA und Ubiquitin, jedoch negativ für Tau-Protein sind, ist zwar aus Untersuchungen an Alzheimer Gehirnen bekannt, gehört dort jedoch nicht zur Regel, sondern wird in der Fachliteratur zu den „neuritischen Abnormalitäten“ gezählt [Ellison et al. 2004]. Weitere Erkenntnisse, die die Plaquemorphologie oder ihre Immunreaktivität betreffen, sind gegenwärtig noch nicht greifbar, und auch die Interpretation der vorhandenen Ergebnisse scheint noch kontrovers.

## 1.5 Fragestellung

1. Lässt sich in senilen Plaques bei DAT-Fällen eine  $\alpha$ -Synuklein-Immunreaktivität nachweisen?

2. Weisen senile Plaques bei DLB-Fällen und in Kontrollfällen eine  $\alpha$ -Synuklein-Immunreaktivität auf?

3. Was ergibt der Vergleich seniler Plaques bei DLB-Fällen und Kontrollfällen hinsichtlich der Dichte der Plaques und ihres immunhistologischen Markierungsmusters?

4. Was ergibt der Vergleich mit Befunden bei der DAT einer Parallelstudie?

## 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 diese Arbeit richtete sich nach klinischen und neuropathologischen Auswahlkriterien: Es wurden nur solche Patienten eingeschlossen, die sowohl eine klinisch bekannte Demenz auf dem Sektionsprotokoll, als auch eine neuropathologisch verifizierte Alzheimer bzw. DLB Pathologie aufwiesen. Die entsprechenden Fälle wurden histomorphologisch reevaluiert und nach der CERAD und Braak-Klassifikation [Ellison 2004] und nach den neuropathologischen Diagnosekriterien für die DLB [McKeath et al. 2005] klassifiziert. Die neuropathologische Diagnostik erfolgte nach der CERAD/Braak Klassifikation und nach den neuropathologischen Diagnosekriterien für die DLB [McKeath et al. 2005].

Zwei der ursprünglich 43 ausgewählten DAT Patienten konnten nachträglich als DLB Fälle klassifiziert werden. Hier waren mehrere  $\alpha$ -Synuklein positive,  $\beta$ -Amyloid negative, intraneuronale Einschlusskörper aufgefallen, die sich in der Ubiquitin Immunhistologie ebenfalls darstellten und somit als Lewy Körperchen identifiziert werden konnten. Zur sicheren Diagnose wurden von diesen Gehirnen auch mesenzephal und pontine Schnitte ausgewertet, auch hier zeigten sich erwartungsgemäß zahlreiche Lewy Körperchen. Das endgültige Untersuchungskollektiv umfasst so 41 DAT-Patienten und 11 Patienten, die einer DLB zugeordnet werden können.

Außerdem wurde eine Kontrollgruppe von 10 Personen ähnlichen Alters ohne klinische Demenzanamnese untersucht. Voraussetzung war der Nachweis von einzelnen,  $\beta$ -Amyloid positiven Plaques in der neuropathologischen Untersuchung bei gleichzeitigem Fehlen jeglichen Hinweises auf eine Erkrankung aus dem dementiellen Formenkreis in der klinischen Befundbeschreibung. Patienten mit

Tumorerkrankungen oder anderen schwerwiegenden Systemerkrankungen, beispielsweise HIV oder Lupus Erythematoses, wurden ausgeschlossen. Ebenso Patienten mit vorbestehenden Erkrankungen des zentralen Nervensystems oder beschriebener Störung aus dem psychiatrischen Formenkreis.

Unter den 41 DAT-Patienten befinden sich 23 weibliche und 18 männliche Patienten. Die Patientenalter haben ein arithmetisches Mittel bei 78 Jahren und einen Median (m) ebenfalls bei 78 Jahren. Die Variationsbreite befindet sich zwischen 55 und 95 Jahren.

Das DLB Kollektiv besteht aus 2 weiblichen und 9 männlichen Patienten mit einem arithmetischen Mittel bei 76 Jahren und einem Median (m) bei 78 Jahren, verteilt zwischen dem 65 und 85 Lebensjahr. Die Gruppe mit Patienten ohne klinische Demenzzzeichen umfasst fünf weibliche und 5 männliche Patienten im Alter von 69-86 Lebensjahren mit einem arithmetischen Mittel von 78 Jahren und einem Median 75 <m> 82 Jahren. Alle Patienten starben eines natürlichen Todes. Im Anhang sind in der Tabelle "Untersuchungskollektiv" die Patientendaten im einzelnen aufgelistet.

## **2.2 Gewebeproben**

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben stammen aus 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 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). Bei der DLB untersuchten wir zusätzlich Proben aus der Pons (mit Locus coeruleus) und dem Mesencephalon.

Allerdings lagen nicht bei allen Fällen Gewebeproben sämtlicher zu untersuchender Regionen vor. Diese Fälle sind im Anhang in der Tabelle "Untersuchte Paraffinblöcke" gekennzeichnet. Bei den 41 DAT-Fällen fehlten einmal

2 Paraffinblöcke und zwölfmal ein Paraffinblock. Bei den 11 DLB-Fällen und den 10 Kontrollfällen fehlte jeweils 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 6 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.

Antigen	AK Klon	Monoklonal/ Polyklonal	Ig. Klasse	Herkunft	Verdünn.	Vorbehandlung	Hersteller
Tau Protein		Polyklonal		Kaninchen	1:800	nein	DAKO
PHF Tau Protein	AT8	Monoklonal	Ig-G1κ	Maus	1:500	nein	Innogenetics
α-Synuklein	LB509	Monoklonal	Ig-G1κ	Maus	1:100	nein	Zymed Laboratories
β-Protein	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
ChromograninA	DAK-A3	Monoklonal	IgG2 κ	Maus	1:200	Kochen in Citratpuffer für 15 min	DAKO

Tabelle 2.1 Verwendete Antikörper

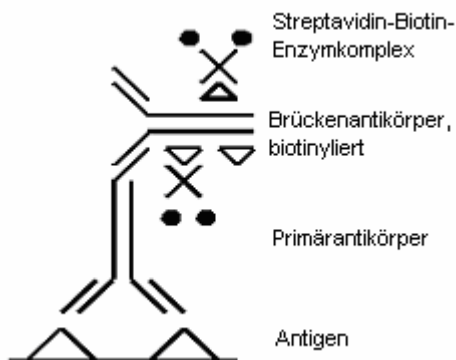


Abbildung 2.1

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 Kaninchenimmunglobulin) gerichtet ist. An den biotinylierten Zweitantikörper bindet sich kovalent ein Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex (siehe Abb. 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 Abb. 2.2) DAB ein braunes, in organischen Lösungsmitteln schwer lösliches Präzipitat bildet, wodurch das gesuchte Antigen im Gewebe sichtbar gemacht wird [Boenisch 2003]. Folgende Reagenzien wurden bei der StreptABC-Methode verwendet:

Reagens A	Streptavidin, DAKO K 492	1ml Streptavidin in 0,01mol/l phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung, 15 mmol/l $\text{NaN}_3$ , pH 7,2
Reagens B	Biot. Peroxidase, DAKO K 492	1ml biotinylierte Meerrettich-Peroxidase in 0,01mol/l phosphatgepufferter physiol. Kochsalzlösung, 15 mmol/l $\text{NaN}_3$ , 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 $\text{NaN}_3$ , pH 7,2
Goat Serum	Ziegenserum, DAKO X 907	Pool unverdünnten Ziegenserums in flüssiger Form, 15mmol/l $\text{NaN}_3$ , pH 7,2

Tabelle 2.2 A, B und C Reagenz enthalten in DAKO®StreptAB-Komplex/ HRP-Duett (Maus/Kaninchen), Kit Code K492

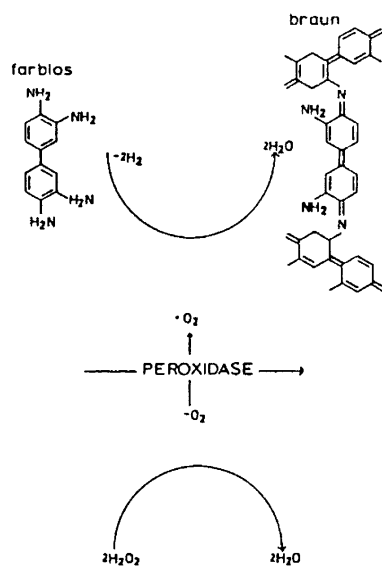


Abbildung 2.1 Chromogene Oxidationsreaktion

Die Gebrauchslösungen des biotinylierten Brückenantikörpers und des Strept-ABComplex/HRP werden vor der Verwendung im Verhältnis 1:100 mit 0,75% ALB-PBS verdünnt. DAB wurde kurz vor Gebrauch folgendermaßen angesetzt: DAB in sechsfacher Menge PBS gelöst und dann Zugabe von 120  $\mu\text{l}$  30% Wasserstoffperoxid pro 60mg DAB.

### 2.3.1 Durchführung der immunhistologischen Untersuchungen

Zur immunhistochemischen Färbung mit DAKO®-StreptAB-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 Pufferstammlösungen

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:

- Ameisensäurebehandlung bei β-Amyloid: 3min in 99% Ameisensäure bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend 3x mit PBS spülen

Kochen in Citratpuffer bei ChromograninA 15 min, dann 20 min abkühlen lassen.

- Restliche AK ohne Vorbehandlung verbleiben in PBS

-8 min 3% Wasserstoffperoxid zur Blockierung der endogenen 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.: Tau, AT8,  $\alpha$ -Synuklein,  $\beta$ -Amyloid, Ubiquitin, ChromograninA, 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), 2xspülen mit PBS
- Präparate in Glasküvette mit PBS
- 6 min entwickeln mit DAB-Substrat, 3x spülen mit A. dest.
- H.-E.-Reihe für 2 min
- Präparate für 2 min in Leitungswasser
- Aufsteigende Alkoholreihe, Verbleiben der Präparate in Xylol
- Eindeckeln in ZytosealXYL (xylenbasierend, Fa. Richard-Allan Scientific)

## 2.4 Befundauswertung

Die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Präparate erfolgte mit dem Lichtmikroskop.

### 2.4.1 Bestimmung der Plaquedichte

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-, DLB- und Kontrollfälle durchgeführt und in einem zu diesem Zweck entwickelten Auswertungsbogen schriftlich festgehalten. Ebenso wurde mit der Kontrollgruppe verfahren.

#### **2.4.2 Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein**

In einem weiteren Schritt wurden die mit dem  $\alpha$ -Synuklein- AK inkubierten Schnitte der 41 Fälle mit klinisch und neuropathologisch gesicherter Alzheimer Diagnose auf  $\alpha$ -Synuklein positive Plaques und eventuell vorhandene Lewy Körperchen-Pathologie untersucht. Im Gegenzug wurden die DLB Fälle auf Alzheimer Pathologie mit  $\alpha$ -Synuklein-Positivität untersucht.

Der Vollständigkeit halber wurden in der Kontrollgruppe vorhandene Plaques ebenfalls auf  $\alpha$ -Synuklein-Positivität gesichtet.

Dadurch wurde gleichzeitig die jeweilige Zuordnung der Diagnose überprüft, da einerseits eine gewisse Überlappung der Pathologie (s.o.) die Einteilung erschweren kann, und andererseits zum Zeitpunkt der neuropathologischen Diagnosestellung der Fälle vor 1996 die DLB als eigenes Krankheitsbild noch weitgehend unbekannt war und keine neuropathologischen Diagnosekriterien existierten.

Der eigentliche Hauptteil der Auswertung besteht aus zwei Teilen. Hierbei wurde die Blockkonstellation Kortex im Lobus frontalis, Hippocampus und Area striata im Lobus Okzipitalis untersucht.

#### **2.4.3 Immunreaktivität ChromograninA positiver Plaques**

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 (zur späteren Dokumentation 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 denselben Plaque in den korrespondierenden Paraffinschnitten mit

anderen Antikörperreaktionen gut wiederfinden und sein Markierungsmuster mit den verschiedenen Antikörpern vergleichen zu können. Eine positive Immunreaktion mit einem anderen 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. Die Unterteilung erfolgte, angelehnt an die Einteilung mittels Versilberungstechnik beschrieben in Ellison et al. 2004, bzw. nach Yaari et al. 2007, in diffuse Plaques, klassische Plaques und dense-core Plaques. Zur genauen Beschreibung der Plaquetypen s.o.

#### **2.4.4 Immunreaktivität AT8- positiver Plaques**

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 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 Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein

Es folgt die Auswertung von 41 DAT Fällen, 11 DLB Fällen und der Kontrollgruppe von 10 Fällen. Es wurden die Sektionsblöcke aus dem Kortex, im lobus frontalis, Hippocampus und lobus okzipitalis, untersucht. In den DAT Schnitten wurden  $\alpha$ -Synuklein positive Plaques und eventuell vorhandene Lewy Körperchen-Pathologie gesucht. Auch die DLB Fälle wurden auf Alzheimer Pathologie mit  $\alpha$ -Synuklein-Positivität untersucht.

##### 3.1.1 Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein bei DAT Fällen

Bei den 41 DAT Fällen sind in sieben Einzelpräparaten  $\alpha$ -Synuklein positive Strukturen markiert worden. Alle 36 übrigen Fälle sind in jedem untersuchten Schnitt  $\alpha$ -Synuklein negativ (siehe hierzu Abb.5.1a-f, 5.2a-f, 5.3a-f.).

Fall	Hirnregion	$\alpha$ -Synuklein	Anzahl	B-Amyloid	Ubiquitin
DAT 23	A: frontal G:Hippokampus I: okzipital	Extrazellulär diffus	jeweils eine Stelle	negativ	negativ
DAT 25	K: Hippokamp. N: okzipital	Extrazellulär diffus Extrazellulär, perivasal	jeweils eine Stelle	negativ	negativ
DAT 27	I: Hippokampus	Extrazellulär perivasal	Mehrere	negativ	negativ
DAT 28	M: okzipital	Intraneuronal	eine Stelle	negativ	negativ
DAT 29	C: frontal	Intraneuronal	eine Stelle	negativ	negativ
DAT 34	B: frontal	Intraneuronal	eine Stelle	negativ	negativ
DAT 36	Q okzipital	Intraneuronal	eine Stelle	positiv	negativ

Tabelle 3.1 DAT- Fälle mit  $\alpha$ -Synuklein positiven Strukturen

Es handelte sich hierbei in drei Fällen, in DAT 23, DAT 25 und DAT 27, um extrazelluläre  $\alpha$ -Synuklein-positive fibrilläre Strukturen, die sich in zwei Präparaten perivaskulär anreicherten. In allen Fällen waren diese Bereiche sowohl in der  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie, als auch in der Ubiquitin-Immunhistologie negativ.

In sechs von sieben Fällen wurden eine bis mehrere intraneuronale Strukturen markiert. Drei dieser Fälle waren an den jeweiligen Markierungen ebenfalls  $\beta$ -Amyloid bzw. Ubiquitin negativ. In Fall DAT 36 war die intraneuronale in einem okzipitalen Hirnschnitt dargestellte Struktur leicht  $\beta$ -Amyloid positiv. Es waren keine immunreaktiven Plaques in der  $\alpha$ -Synuklein Immunhistologie nachzuweisen.

### **3.1.2 Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein bei DLB Fällen**

Abgesehen von DLB spezifischer Pathologie (Lewy-Körperchen, Lewy-Neuriten) war keine weitere Immunreaktivität nachzuweisen. Keiner der in den Präparaten vorliegenden senilen Plaques war mit dem verwendeten  $\alpha$ -Synuklein AK markiert.

### **3.1.3 Immunreaktivität für $\alpha$ -Synuklein bei Fällen der Kontrollgruppe**

Es wurden zehn Fälle klinisch nicht dementer Patienten auf  $\alpha$ -Synuklein positive Strukturen untersucht. Alle zehn untersuchten Fälle waren  $\alpha$ -Synuklein negativ. Senile Plaques konnten in der  $\alpha$ -Synuklein Immunhistologie nicht dargestellt werden, ebenso wenig wie DLB spezifische Pathologie.

## 3.2 Dichte immunreaktiver seniler Plaques

### 3.2.1 Dichte immunreaktiver seniler Plaques bei DAT-Fällen

Polyklonaler Tau Protein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	36(100%)	41(100%)	30(100%)
-	3(8,34%)	1(2,44%)	4(13,34%)
1+	7(19,45%)	3(7,32%)	4(13,34%)
2+	22(61,12%)	21(51,22%)	17(56,67%)
3+	3(8,34%)	11(26,83%)	4(13,34%)
4+	1(2,78%)	5(12,2%)	1(3,34%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.2

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des polyklonalen Antikörpers gegen Tau-Protein bei DAT-Fällen

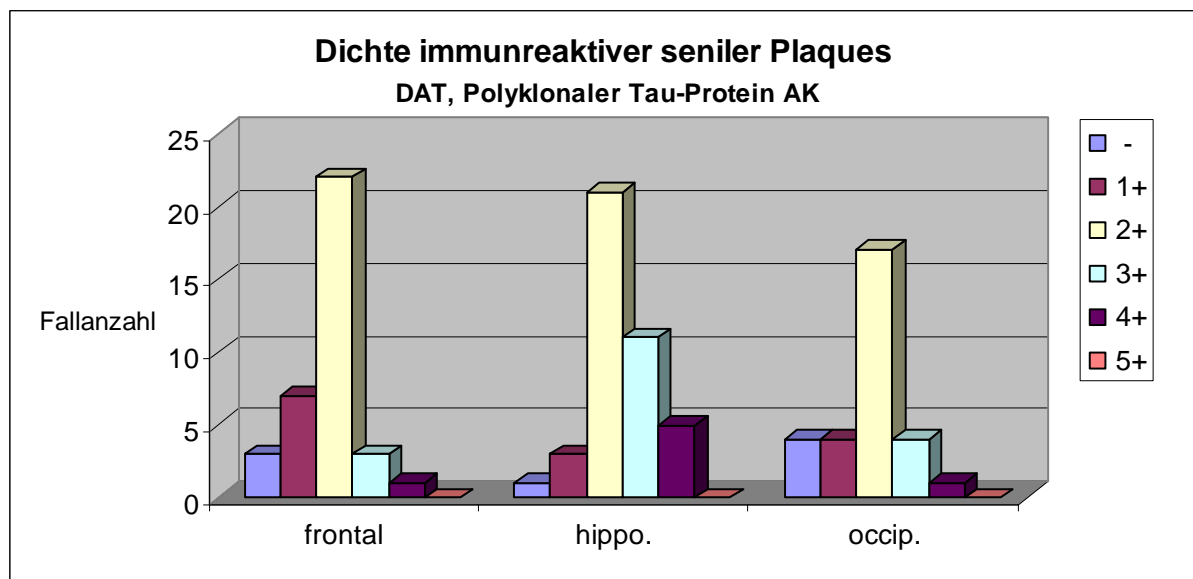


Abb. 3.1

Monoklonaler PHF-Tau(AT8) AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	36(100%)	41(100%)	30(100%)
-	3(8,34%)	1(2,44%)	4(13,34%)
1+	7(19,45%)	2(4,88%)	5(16,67%)
2+	13(36,12%)	13(31,71%)	14(46,67%)
3+	10(27,78%)	18(43,91%)	6(20%)
4+	3(8,34%)	7(17,07%)	1(3,34%)
5+	0(0%)	0(0%)	0

Tabelle 3.3

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen PHF-Tau (AT-8) bei DAT-Fällen

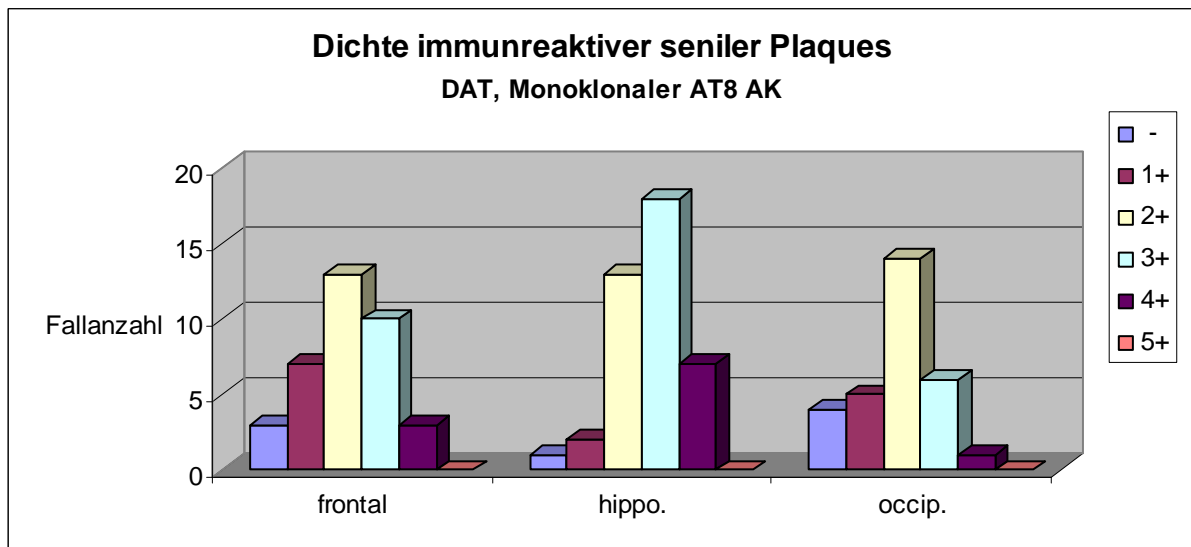


Abb. 3.2

Monoklonaler α-Synuklein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	36(100%)	41(100%)	30(100%)
-	36(100%)	41(100%)	30(100%)
1+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
2+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
3+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.4

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen α-Synuklein bei DAT-Fällen.

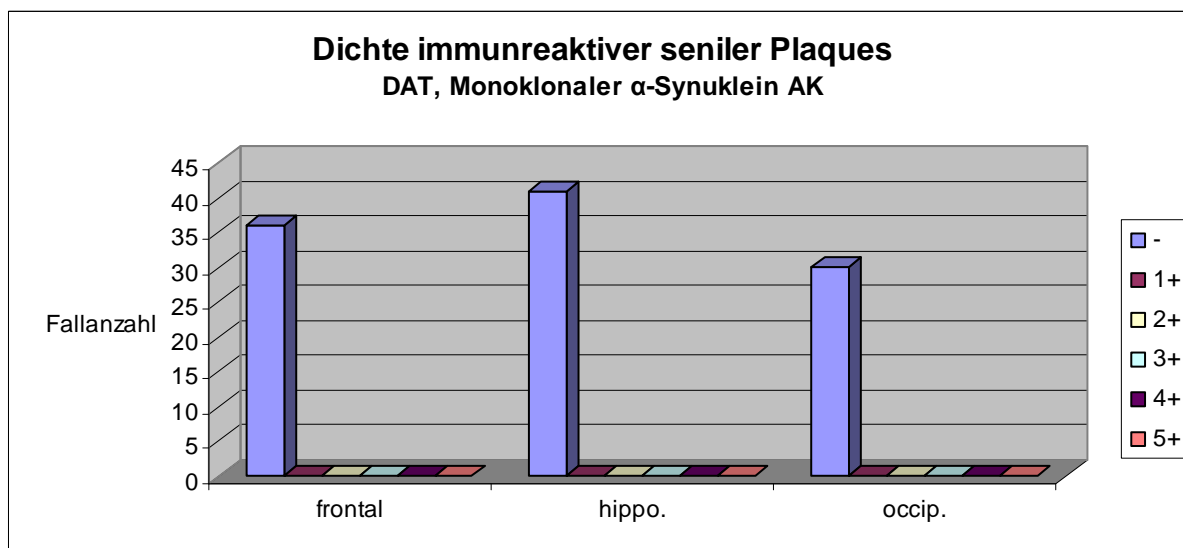


Abb. 3.3

Monoklonaler $\beta$ -Amyloid AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo	occip
$\Sigma$	36(100%)	41(100%)	30(100%)
-	1(2,78%)	1(2,44%)	0(0%)
1+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
2+	1(2,78%)	6(14,63%)	7(23,33%)
3+	12(33,34%)	24(58,54%)	13(43,33%)
4+	18(50%)	9(21,95%)	10(33,33%)
5+	4(11,12%)	1(2,44%)	0(0%)

Tabelle 3.5

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen  $\beta$ -Amyloid bei DAT-Fällen.

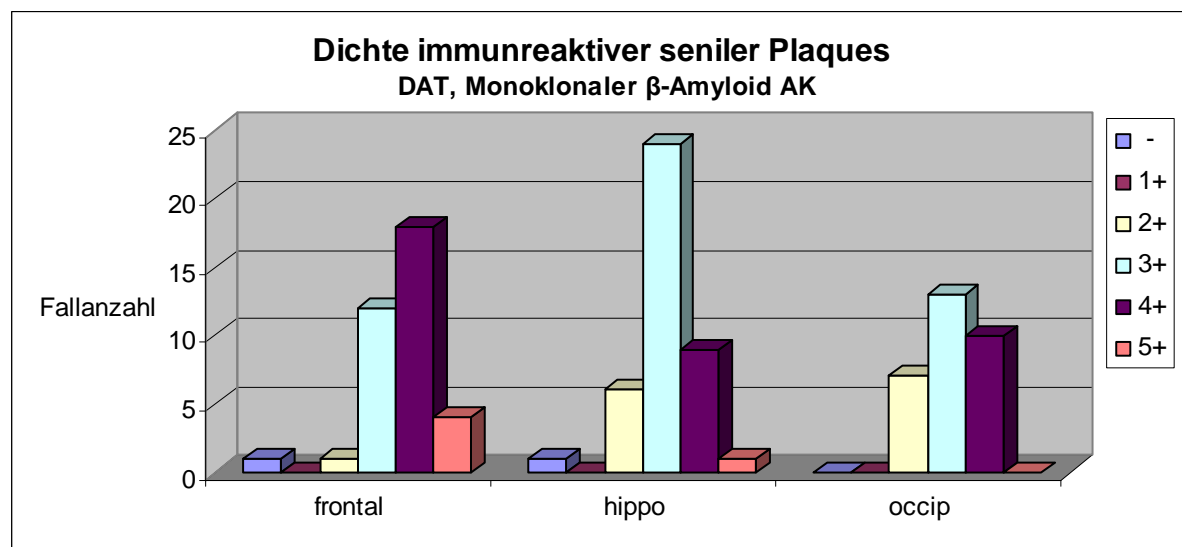


Abb. 3.4

Plaquedichte	Polyklonaler Ubiquitin AK		
	Fallzahl.		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	36(100%)	41(100%)	30(100%)
-	6(16,67%)	5(12,2%)	2(6,67%)
1+	4(11,11%)	3(7,32%)	4(13,34%)
2+	20(55,56%)	23(56,1%)	17(56,67%)
3+	6(16,67%)	9(21,95%)	7(23,33%)
4+	0(0%)	1(2,44%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.6

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des polyklonalen Antikörpers gegen Ubiquitin bei DAT-Fällen.

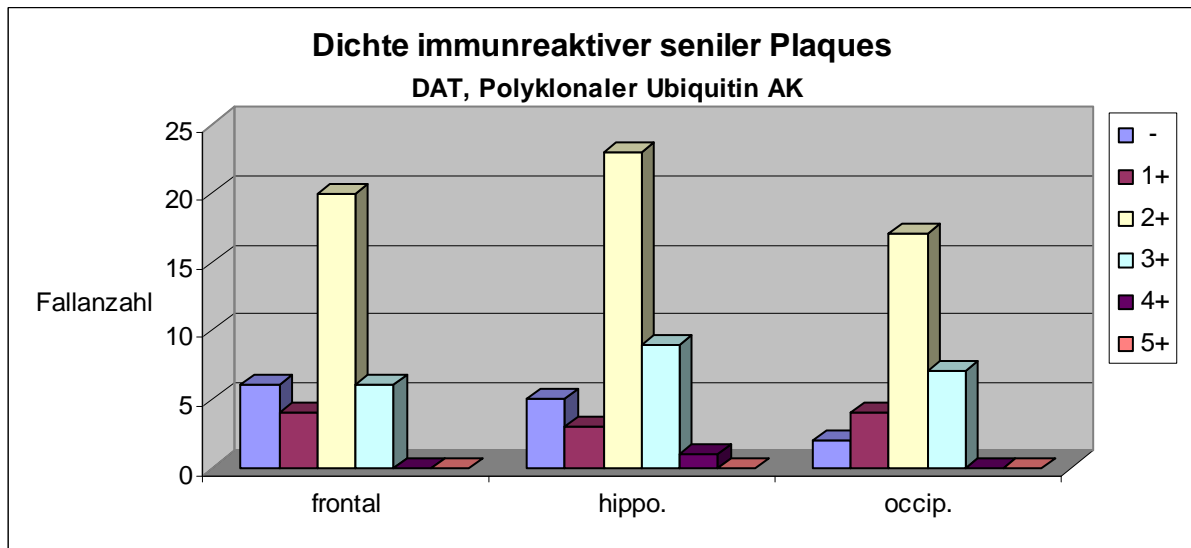


Abb. 3.5

Plaquedichte	Monoklonaler ChromograninA AK		
	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	36(100%)	41(100%)	30(100%)
-	4(11,11%)	6(14,63%)	3(10%)
1+	6(16,67%)	7(17,07%)	1(3,34%)
2+	23(63,89%)	26(63,41%)	20(66,67%)
3+	3(8,34%)	2(4,88%)	6(20%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.7

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen Chromo-graninA bei DAT Fällen.

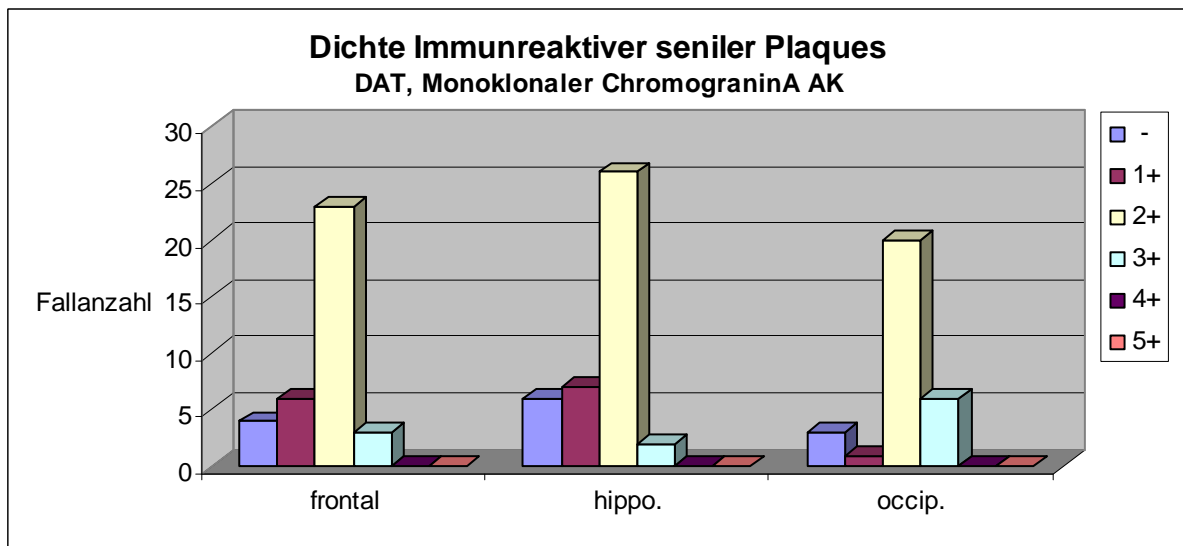


Abb. 3.6

### 3.2.2 Dichte immunreaktiver seniler Plaques bei DLB -Fällen

Polyklonaler Tau Protein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	11(100%)	11(100%)	9(100%)
-	2(18,18%)	1(9,09%)	4(0,44%)
1+	4(36,36%)	3(27,27%)	4(0,44%)
2+	5(45,45%)	6(54,54%)	1(11,11%)
3+	0(0%)	1(9,09%)	0(0%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.8

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des polyklonalen Antikörpers gegen Tau-Protein bei DLB-Fällen

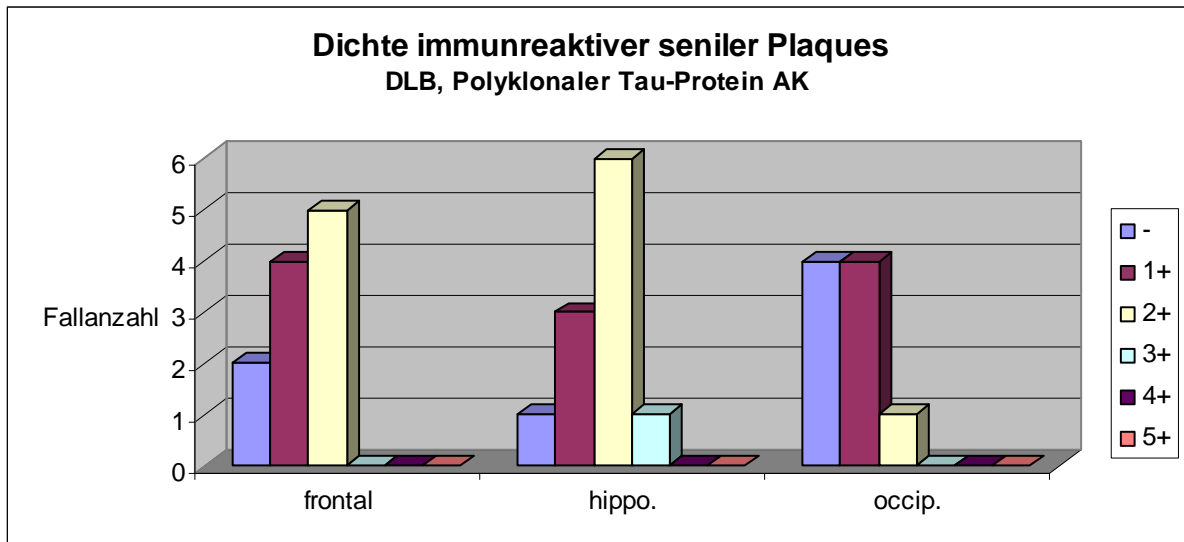


Abb. 3.7

Monoklonaler AT8 AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	11(100%)	11(100%)	9(100%)
-	2(18,18%)	1(9,09%)	3(33,33%)
1+	4(36,36%)	3(27,27%)	5(55,56%)
2+	4(36,36%)	4(36,36%)	1(11,11%)
3+	1(9,09%)	3(27,27%)	0(0%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.9

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen PHF-Tau (AT-8) bei DLB-Fällen

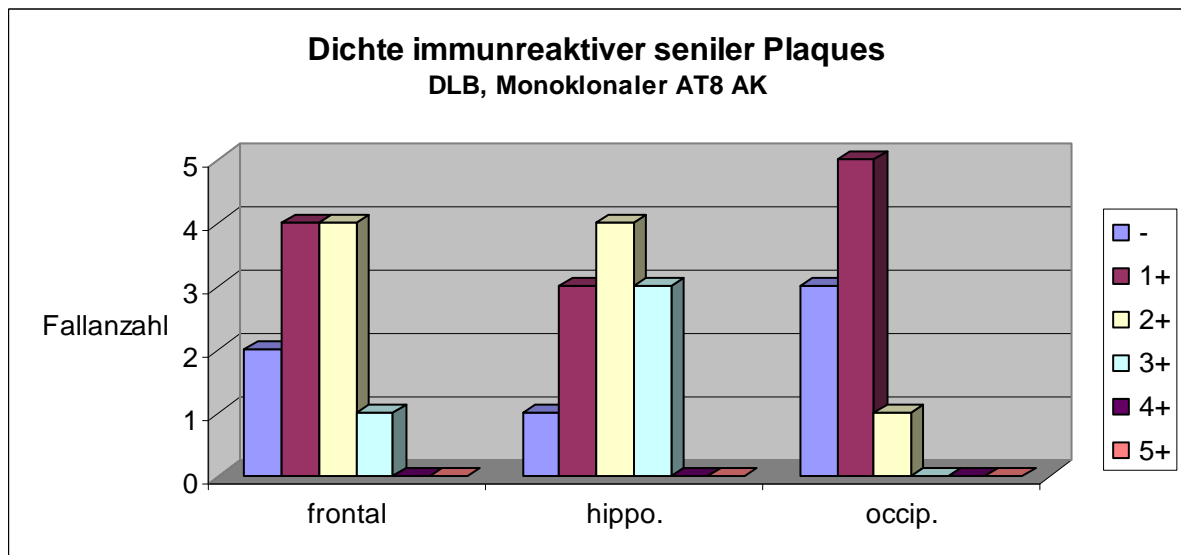


Abbildung 3.8

Monoklonaler $\alpha$ -Synuklein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	11(100%)	11(100%)	9(100%)
-	11(100%)	11(100%)	9(100%)
1+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
2+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
3+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.10

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen  $\alpha$ -Synuklein bei DLB-Fällen.

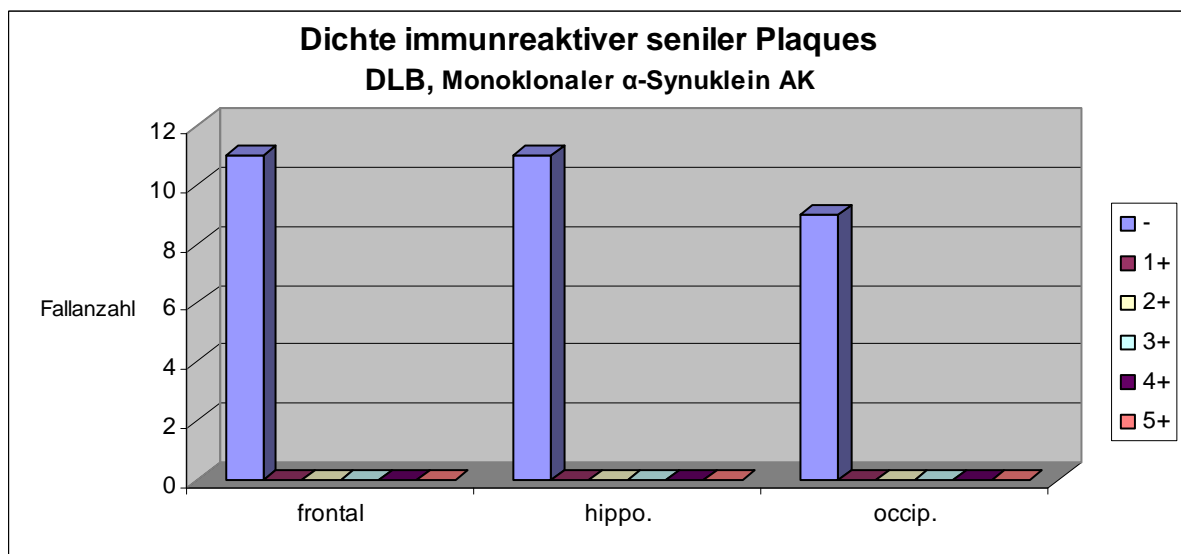


Abb. 3.9

Monoklonaler $\beta$ -Amyloid AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	11(100%)	11(100%)	9(100%)
-	1(9,09%)	2(18,18%)	0(0%)
1+	1(9,09%)	0(0%)	2(22,22%)
2+	2(18,18%)	3(27,27%)	5(55,56%)
3+	3(27,27%)	6(54,54%)	2(22,22%)
4+	4(36,36%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.11

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen  $\beta$ -Amyloid bei DAT-Fällen.

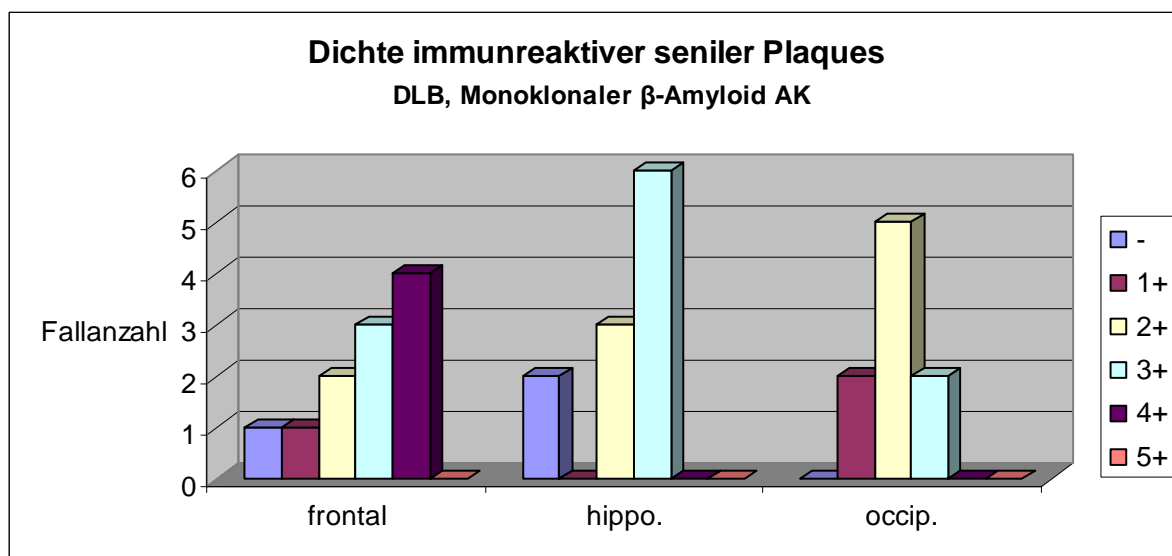


Abb. 3.10

Polyklonaler Ubiquitin AK			
Plaquedichte	Fallzahl.		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	11(100%)	11(100%)	9(100%)
-	1(9,09%)	1(9,09%)	1(11,11%)
1+	1(9,09%)	0(0%)	1(11,11%)
2+	9(81,82%)	8(72,73%)	7(77,78%)
3+	0(0%)	2(18,18%)	0(0%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.12

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des polyklonalen Antikörpers gegen Ubiquitin bei DLB-Fällen.

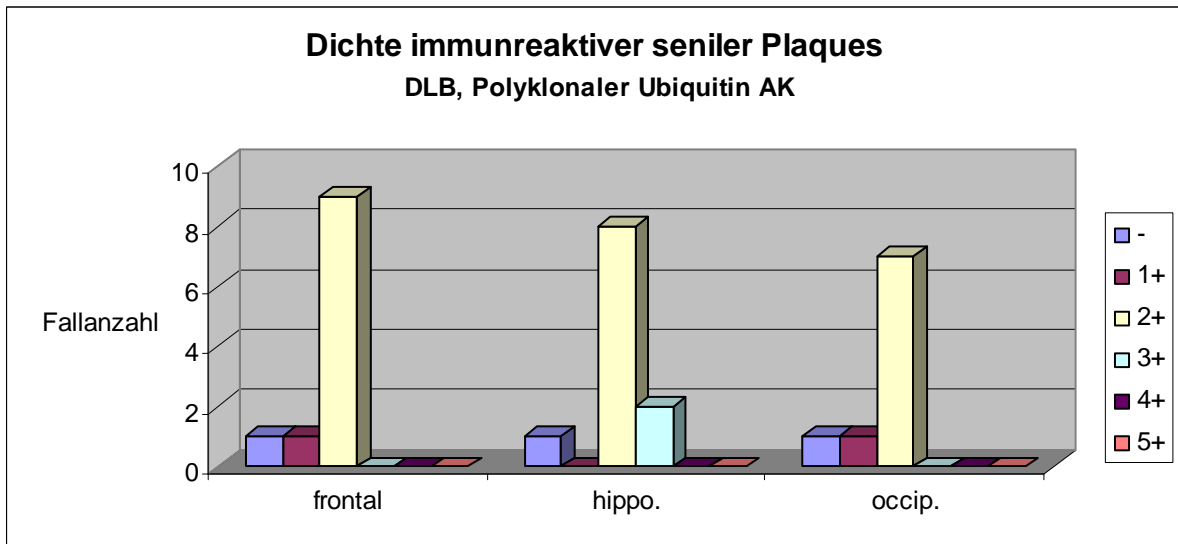


Abb. 3.11

Monoklonaler ChromograninA AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	11(100%)	11(100%)	9(100%)
-	1(9,09%)	1(9,09%)	1(11,11%)
1+	0(0%)	2(18,18%)	1(11,11%)
2+	10(90,91%)	7(63,64%)	7(77,78%)
3+	0(0%)	1(9,09%)	0(0%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.13

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen  $\beta$ -Amyloid bei DLB-Fällen.

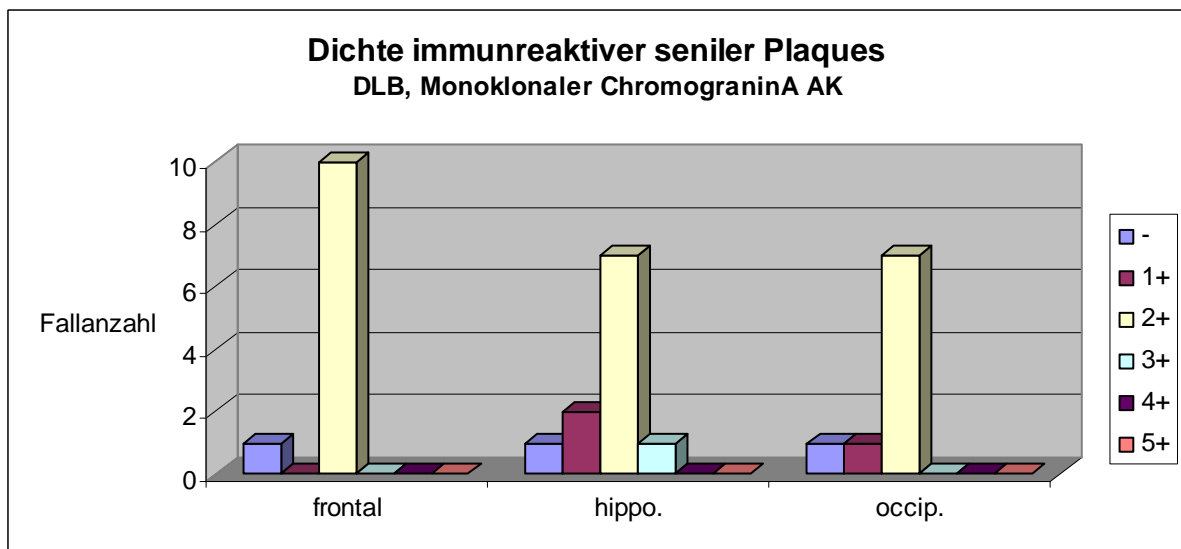


Abb. 3.12

### 3.2.3 Dichte immunreaktiver seniler Plaques bei Fällen der Kontrollgruppe

Polyklonaler Tau Protein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	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 3.14

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des polyklonalen Antikörpers gegen Tau-Protein bei Fällen der Kontrollgruppe

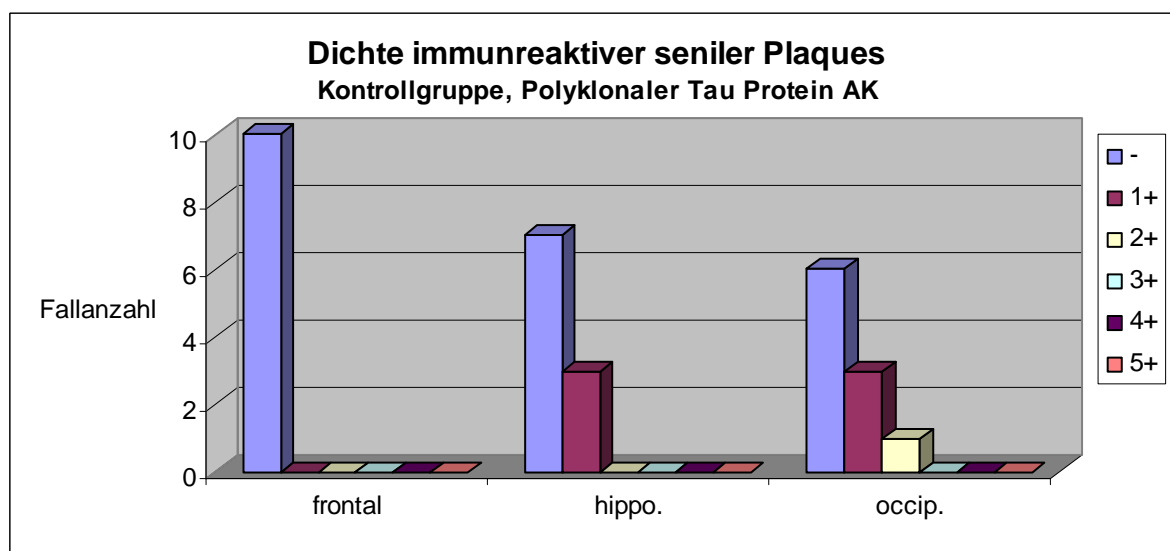


Abb. 3.13

Monoklonaler AT8 AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
Σ	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 3.15

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen PHF-Tau (AT-8) bei Fällen der Kontrollgruppe.

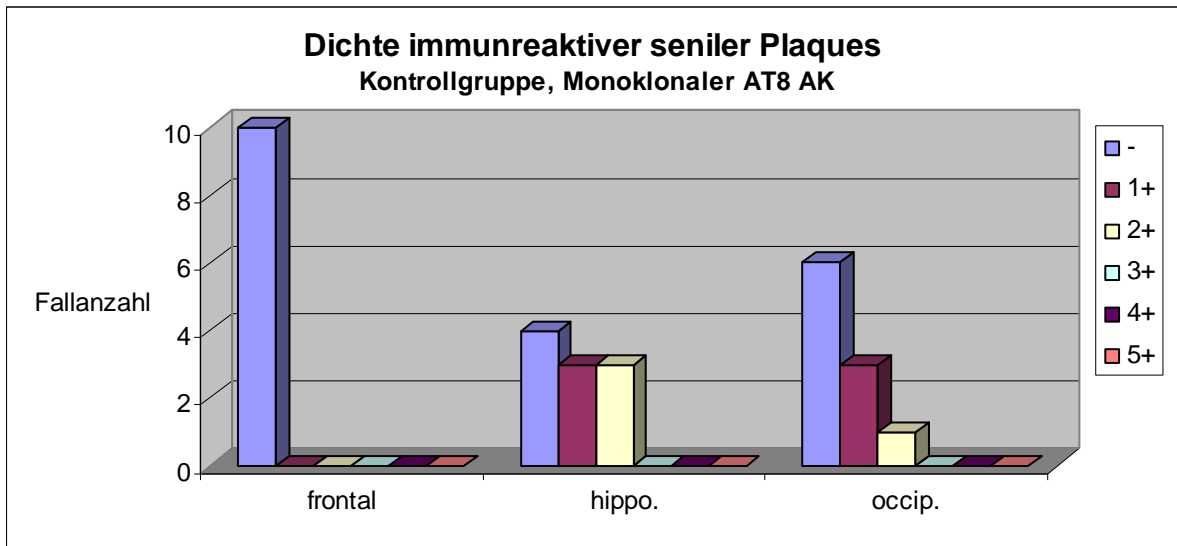


Abb. 3.14

Monoklonaler $\alpha$ -Synuklein AK			
Plaquedichte	Fallzahl		
	frontal	hippo.	occip.
$\Sigma$	10(100%)	10(100%)	10(100%)
-	10(100%)	10(100%)	10(100%)
1+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
2+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
3+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
4+	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5+	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Tabelle 3.16

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen  $\alpha$ -Synuklein bei Fällen der Kontrollgruppe.

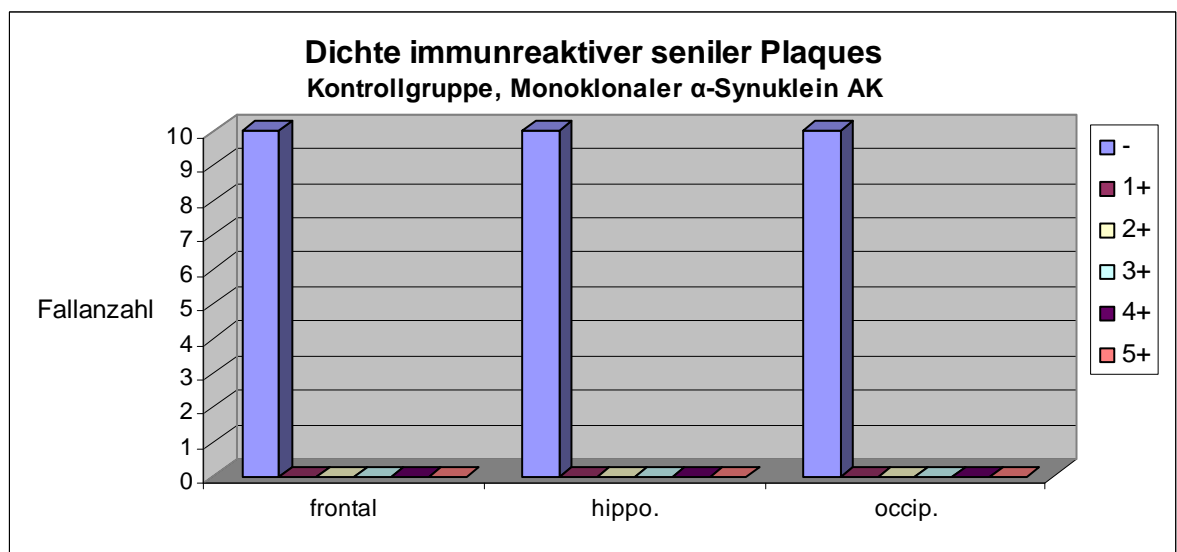


Abb. 3.15

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 3.17

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen  $\beta$ -Amyloid bei Fällen der Kontrollgruppe

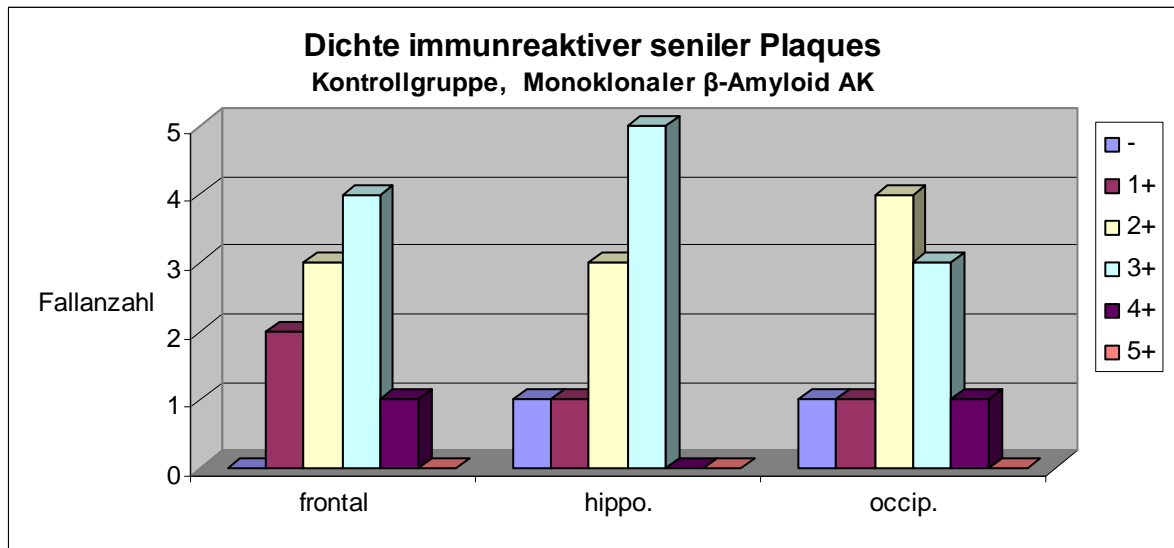


Abb. 3.16

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 3.18

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des polyklonalen Antikörpers gegen Ubiquitin bei Fällen der Kontrollgruppe.

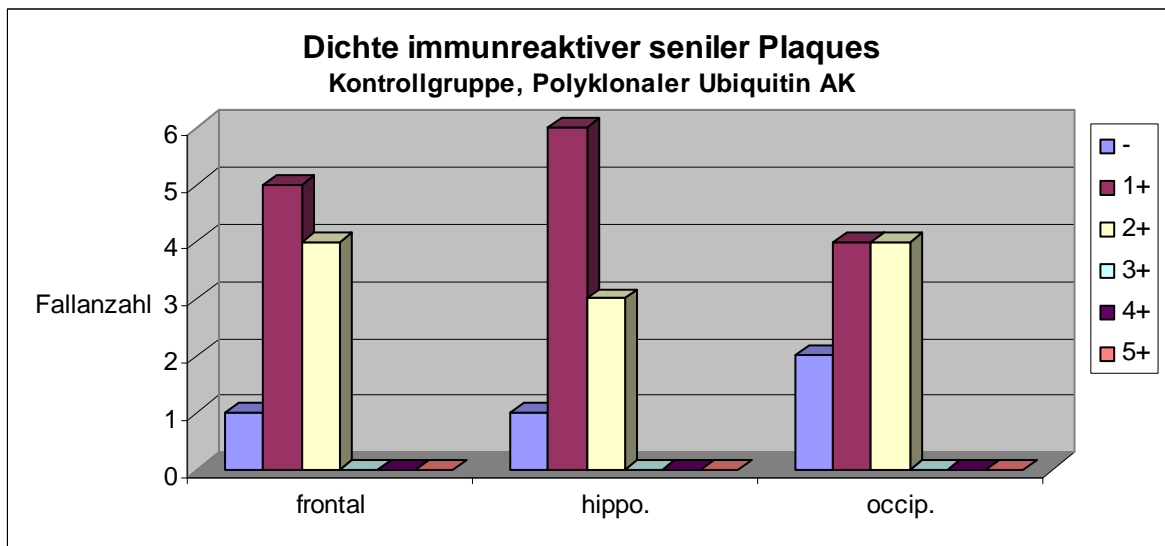


Abb. 3.7

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 3.19

Dichte der senilen Plaques bei Anwendung des monoklonalen Antikörpers gegen  $\beta$ -Amyloid bei Fällen der Kontrollgruppe.

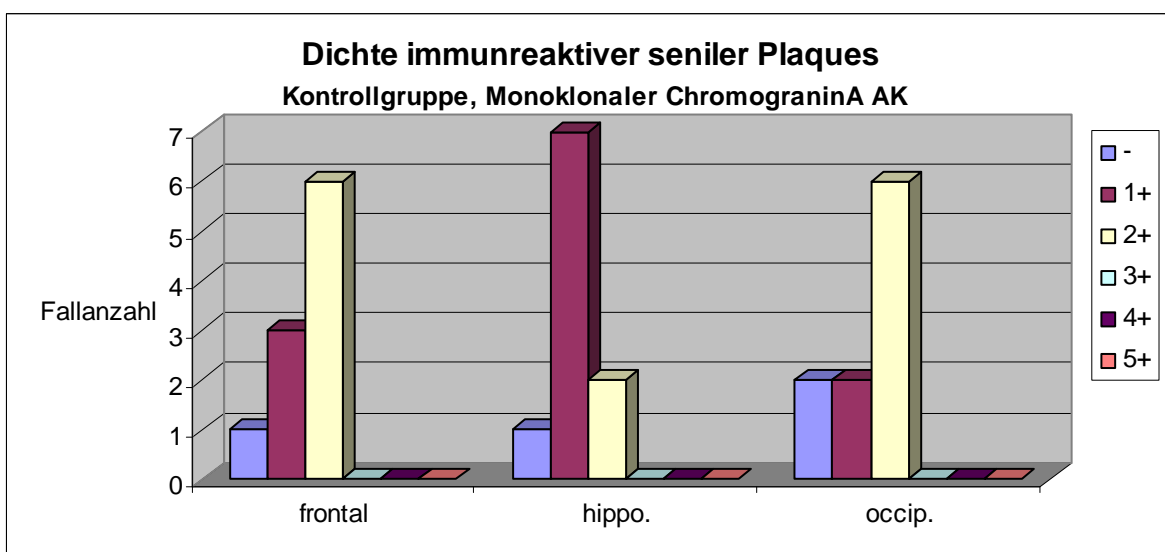


Abb. 3.8

### 3.3 Vergleichende immunhistologische Untersuchungen von senilen Plaques bei DLB Fällen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen von AT8-positiven Plaques einerseits und ChromograninA-positiven senilen Plaques andererseits bei der DLB erläutert dargestellt.

Es wurden insgesamt elf DLB Fälle mit jeweils einem Schnitt der Lokalisationen frontal, hippokampal und okzipital untersucht. Die morphologische Zuordnung der Plaques erfolgte in der  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie nach der in Kapitel zwei erläuterten Methode.

#### 3.3.1 Immunreaktivität AT8-positiver seniler Plaques bei DLB Fällen

In diesem Kollektiv waren wie oben beschrieben sehr viele Präparate bezüglich der senilen Plaques AT8-negativ. Es konnten insgesamt 17 Präparate mit AT8-positiven senilen Plaques untersucht werden.

	A $\beta$ +Ubi+Chromo+	A $\beta$ +Ubi+Chromo-	A $\beta$ +Ubi-Chromo-	A $\beta$ +Ubi-Chromo+
$\Sigma$	4	6	6	1
$\beta$ diffus	2	4	5	1
$\beta$ klassisch	2	2	1	0
$\beta$ dense core	0	0	0	0

Tabelle 3.20

AT8+A $\beta$ + Ubi+ Chromo+	4(23,53%)
AT8+A $\beta$ + Ubi+ Chromo-	6(35,29%)
AT8+A $\beta$ + Ubi- Chromo-	6(35,29%)
AT8+ A $\beta$ + Ubi- Chromo+	1(5,88%)

Tabelle 3.21. Immunreaktivität AT8-positiver Plaques bei DLB

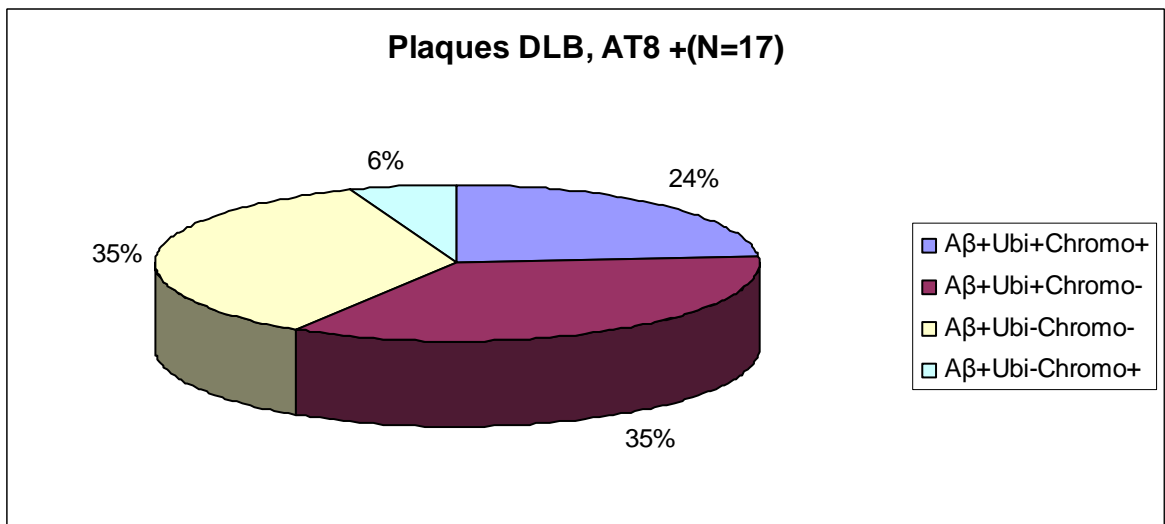


Abb. 3.19.

### 3.3.2 Immunreaktivität ChromograninA-positiver seniler Plaques bei DLB Fällen

In der ChromograninA Immunhistologie konnten insgesamt 53 Plaques auf ihre Immunreaktivität untersucht werden. Der Plaque in der Abb. 5.5a-e stellt ein Beispiel für den hier am häufigsten vertretenen Plaquetyp AT8-, Aβ+ Ubi+ Chromo+ dar.

	AT8+Aβ+Ubi+	AT8-Aβ+Ubi+	AT8-Aβ+Ubi-	AT8+Aβ+Ubi-
Σ	12	36	3	2
β diffus	5	21	2	2
β klassisch	6	15	1	0
β dense core	1	0	0	0

Tabelle 3.22

AT8+Aβ+ Ubi+ Chromo+	12(22,64%)
AT8+ Aβ+ Ubi- Chromo+	2(3,77%)
AT8- Aβ+ Ubi+ Chromo+	36(67,92%)
AT8- Aβ+Ubi- Chromo+	3(5,67%)

Tabelle 3.23: Immunreaktivität ChromograninA-positiver seniler Plaques bei DLB

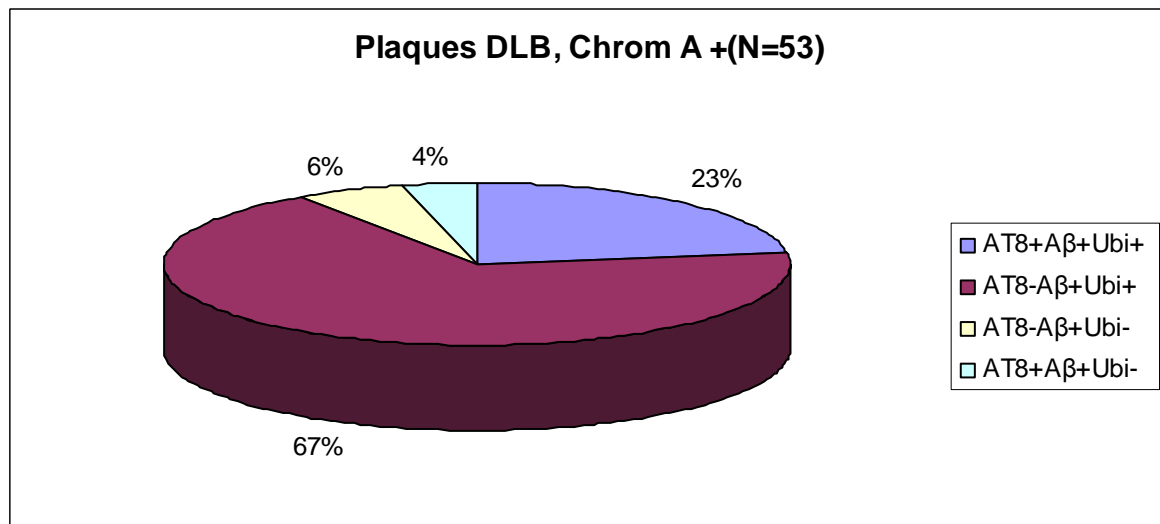


Abb:3.20

### 3.4 Immunhistochemische Untersuchungen von senilen Plaques bei Fällen der Kontrollgruppe

Es werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen von AT-8 positiven Plaques einerseits und ChromograninA positiven Plaques andererseits bei der Kontrollgruppe klinisch nicht dementer Patienten erläutert.

Es wurden insgesamt zehn Fälle mit jeweils einem Schnitt der Lokalisationen frontal, hippokampal und okzipital untersucht. Die morphologische Zuordnung der Plaques erfolgte in der  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie nach der in Kapitel zwei erläuterten Methode. Es handelt sich also bei allen Plaques um senile Plaques.

#### 3.4.1 Immunreaktivität AT8-positiver seniler Plaques bei Fällen der Kontrollgruppe

Es waren hier erwartungsgemäß nur wenige AT8-positive senile Plaques zu finden. Lediglich 10 Plaques entsprechende senile Plaques konnten untersucht werden.

	Aβ+ Ubi+ Chromo+	Aβ+ Ubi+ Chromo-	Aβ+ Ubi- Chromo-	Aβ+ Ubi- Chromo+
Σ	4	4	1	1
β diffus	4	4	1	1
β klassisch	0	0	0	0
β dense core	0	0	0	0

Tabelle 3.24

AT8+Aβ+ Ubi+ Chromo+	4(40%)
AT8+Aβ+ Ubi+ Chromo-	4(40%)
AT8+Aβ+ Ubi- Chromo-	1(10%)
AT8+ Aβ+ Ubi- Chromo+	1(10%)

Tabelle 3.25 Immunreaktivität AT8-positiver seniler Plaques bei Kontrollfällen

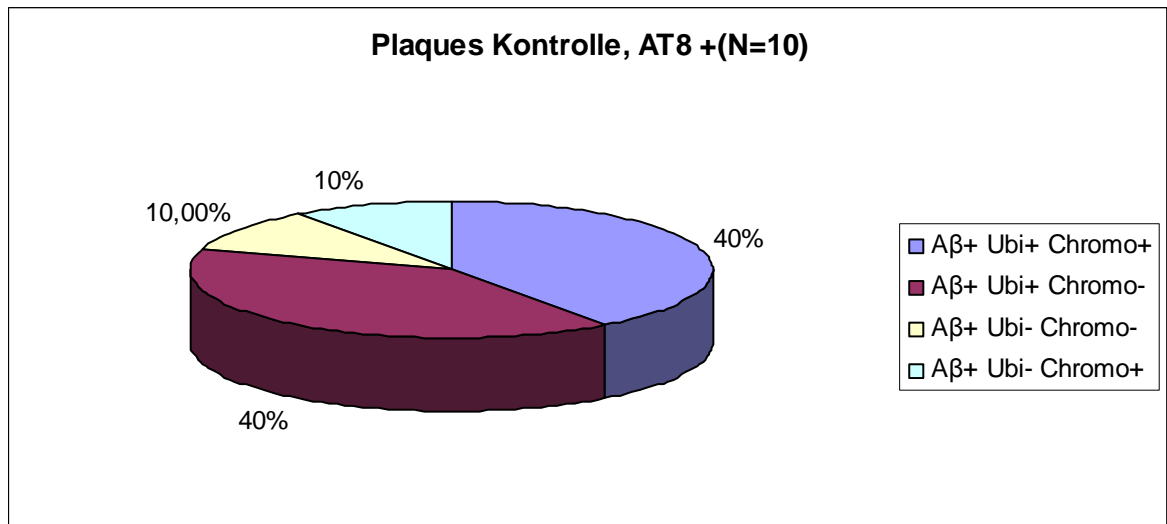


Abb. 3.21

### 3.4.2 Immunreaktivität ChromograninA positiver seniler Plaques bei Fällen der Kontrollgruppe

Es konnten insgesamt 35 senile Plaques untersucht werden. Beispiele für die hier am Häufigsten Vertretene Plaquegruppe, AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ zeigen die Abb. 5.6a-e, 5.7a-e.

	AT8+ A $\beta$ + Ubi+	AT8- A $\beta$ + Ubi+	AT8- A $\beta$ + Ubi-	AT8+ A $\beta$ + Ubi-
$\Sigma$	0	30	5	0
$\beta$ diffus	0	21	4	0
$\beta$ klassisch	0	9	1	0
$\beta$ dense core	0	0	0	0

Tabelle 3.26

AT8+ A $\beta$ + Ubi+ Chromo+	0(0%)
AT8+ A $\beta$ + Ubi- Chromo+	0(0%)
AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+	30(85,71%)
AT8- A $\beta$ + Ubi- Chromo+	5(14,29%)

Tabelle 3.27 Immunreaktivität ChromograninA-positiver seniler Plaques bei Kontrollfällen

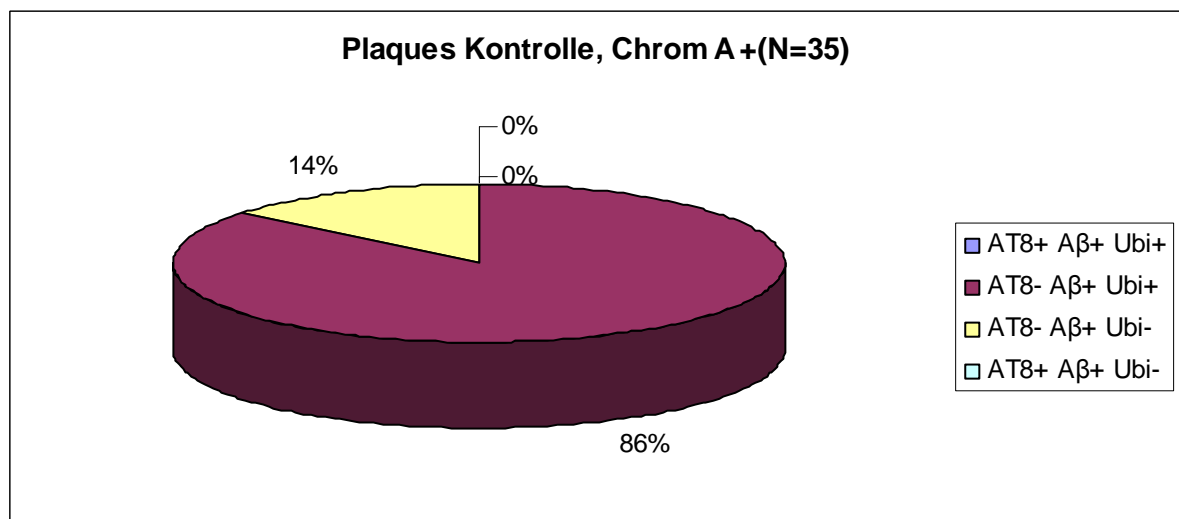


Abb. 3.22

## 4 Diskussion

### 4.1 Material und Methodendiskussion

#### 4.1.1 Begründung für die Wahl der Antikörper

Wie in der Einleitung bereits ausführlich erläutert, ist das gemeinsame Auftreten von neurofibrillären Tangles und senilen Plaques ein histopathologisches Kriterium für die Demenz vom Alzheimer Typ. Das hyperphosphorylierte Tau Protein ist nicht nur in Form von neurofibrillären Tangles, sondern ebenso in den dystrophen Neuriten seniler Plaques mit neuritischer Komponente nachzuweisen [Braak et al. 1991, Dickson 1997, Griffin et al. 1995, Thal et al. 2000]. Senile Plaques lassen sich besonders deutlich in der  $\beta$ -Amyloid-Immunhistologie nachweisen [Braak et al. 1991, Dickson 1997, Ellison et al. 2004]

Zur morphologischen Darstellung bestehen grundsätzlich die Möglichkeiten der  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie und der Versilberung. Die Verwendung konventioneller Silberimprägnationen (Bielschowsky, Bodian) allein zur Darstellung der intraneuronalen und extrazellulären Ablagerungen ist für die zeitgemäße morphologische Diagnostik des Morbus Alzheimer nicht mehr zu empfehlen, da vor allem die Gesamtzahl an Plaques leicht unterschätzt werden kann [Ellison et al. 2004, Thal et al. 2005]. Vielmehr ist die immunhistochemische Darstellung der pathologischen Proteine mit einem gegen das hyperphosphorylierte Tau Protein gerichteten Antikörper sowie mit einem gegen  $\beta$ -Amyloid gerichteten Antikörper zu empfehlen [Thal et al. 2005].

Auf dieser Grundlage ist zum Nachweis dieser pathologischen Befunde in der vorliegenden Arbeit ein Tau Antikörper und ein AT-8 Antikörper (polyklonaler Antikörper gegen Tau-Protein und der Antikörper AT8 gegen das hyperphosphorylierte PHF-Tau) zur Erfassung der Tau Pathologie, sowie ein  $\beta$ -Amyloid Antikörper zur morphologischen Identifikation seniler Plaques gewählt

worden. Entgegen der Erwartung, dass alle mit dem Antikörper AT8 markierten Strukturen auch mit dem polyklonalen Antikörper gegen Tau-Protein markiert werden, ist in der Auswertung der Plaquedichte unseres Kollektivs in Präparaten aller Versuchsreihen eine Diskrepanz aufgefallen. Nicht alle AT8-positiven senilen Plaques konnten auch in der Tau Immunhistologie nachgewiesen werden. Dieses Phänomen ist für andere Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau Protein in der Literatur bereits beschrieben [Su et al. 1994], allerdings ist die genaue Ursache noch unbekannt. Da die Darstellung des hyperphosphorylierten Tau Proteins bei den untersuchten Fragestellungen vorrangig ist, wurde die Tau Immunhistologie zwar ausgewertet, aber ausschließlich die AT8 Immunhistologie in der immunhistochemischen Charakterisierung der senilen Plaques mitberücksichtigt.

Der von uns verwendete  $\alpha$ -Synuklein Antikörper markiert die unter anderem im Western Blot mit 16Kd markierte Bande, ein Bereich in dem man die NAC Komponente seniler Plaques bei der DAT ansiedelt [Culvenor et al. 1999].

Eine weitere Charakterisierung seniler Plaques kann durch ihre Immunreaktivität für Ubiquitin erfolgen. 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]. Da Lewy Körperchen außer mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Synuklein auch mit einem Antikörper gegen Ubiquitin markiert werden, erschien die Verwendung eines Ubiquitin Antikörpers zur genaueren Differenzierung der in der Fragestellung ausgeführten  $\alpha$ -Synuklein Pathologie in Gehirnen von Alzheimer Patienten sinnvoll, da durch die gleichzeitige Markierung  $\alpha$ -Synuklein positiver Strukturen mit Ubiquitin eine Identifikation als Lewy Körperchen vereinfacht wurde.

Chromogranin schließlich spielt sowohl in senilen Plaques von DAT Patienten, als auch in senilen Plaques in Gehirnen von klinisch gesunden Patienten eine Rolle [Ellison et al. 2004]. Es konnte nachgewiesen werden, dass ChromograninA ChromograninB und auch Sekretoneurin II in neuritischen Plaques zu finden sind [Marksteiner et al. 2002].

#### **4.1.2 Verfahren der Auswertung**

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

Bei der Einteilung anhand des dichtesten Plaquevorkommens sind nämlich Schnitte mit mäßig vielen, verstreut gelegenen 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, wieweil die Ergebnisse ebenfalls zu niedrig aus.

#### **4.2 Interpretation des Ergebnisses**

Zu prüfen war mit dieser Arbeit einerseits, ob sich eine manchenorts beschriebene  $\alpha$ -Synuklein Pathologie in unserem DAT Kollektiv ebenfalls nachweisen lässt, und andererseits, inwieweit sich die Plaquepathologie in dem untersuchten DLB Kollektiv und dem Kontrollkollektiv sowie dem DAT Kollektiv tatsächlich auch auf immunhistologischer Ebene ähnelt oder unterscheidet. Hierzu wurden 41 DAT Fälle auf  $\alpha$ -Synuklein positive Strukturen in Plaques, sowie 11 DLB Fälle und eine 10 Fälle umfassende Kontrollgruppe klinisch gesunder Patienten in vergleichbarem Alter bezüglich des immunhistologischen Markierungsmusters ihrer senilen Plaques untersucht.

$\alpha$ -Synuklein scheint das einzige Protein aus der Familie der Synukleine zu sein, das bei bestimmten neurodegenerativen Erkrankungen im Gehirn abgelagert wird. Zahlreiche Studien konnten beweisen, dass  $\alpha$ -Synuklein die Hauptkomponente von Lewy Körperchen und Lewy Neuriten, den neuropathologischen Charakteristika der Parkinson Erkrankung ist [Baba et al. 1998, Irizarry et al. 1998, Takeda et al. 1998,

Wakabayashi et al. 1997]. Des Weiteren finden sich  $\alpha$ -Synuklein-positive Ablagerungen bei der Multisystematrophie, sowie der Demenz mit Lewy Körperchen und einigen anderen in der Einleitung erwähnten  $\alpha$ -Synukleinopathien [Arima et al. 1998, Mezey et al. 1998, Spillantini et al. 1998, Wakabayashi et al. 1998].

Auch in familiären Alzheimer Fällen konnte  $\alpha$ -Synuklein in Form von zahlreich auftretenden Lewy Körperchen nachgewiesen werden [Lippa et al., 1998]. Beim sporadischen Morbus Alzheimer wird über  $\alpha$ -Synuklein als Bestandteil der senilen Plaques allerdings kontrovers diskutiert [Culvenor et al. 1999, Iwai et al. 1995, Masliah et al. 1996, Takeda et al. II 1998, Uéda et al. 1994]. Diese Befunde sollen in dieser Studie überprüft werden.

Bei der Aufbereitung von  $\beta$ -Amyloid Plaques aus DAT Gehirnen mittels Behandlung mit Zitronensäure, Cyanogenen Bromiden und Proteasen, ist, abgesehen vom erwarteten  $\beta$ -Amyloid, das Anfallen von zwei weiteren Proteinresten aufgefallen [Uéda et al. 1993]. Diese Proteine wurden mit dem Terminus Non-Amyloid Component (NAC) der Alzheimerschen Plaques belegt. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Bruchstücke beide Teile eines längeren Vorläuferproteins, des Non-Amyloid Component Precursor (NACP) Proteins sind [Uéda et al. 1993]. Eine nachträgliche Klonierung dieses NACP Proteins und der Vergleich mit anderen Proteinen aus Gendatenbanken legte nahe, dass es sich dabei um ein Protein aus der Gruppe der Synukleine handelt [Culvenor et al. 1999, Uéda et al. 1994]. Durchgeführte Studien mit  $\alpha$ -Synuklein Antikörpern berichten, dass diese einen großen Anteil von Plaquestrukturen der Demenz vom Alzheimer Typ markieren [Iwai et al. 1995, Masliah et al. 1996, Takeda et al. II 1998].

Dieses Ergebnis scheint nicht durchgängig reproduzierbar zu sein, so existiert beispielsweise eine vergleichbare Studie aus dem Jahr 1999 [Culvenor et al. 1999]. Das Untersuchungskollektiv dieser Studie umfasste fünf klinisch und neuropathologisch diagnostizierte Fälle von DLB, weitere fünf Fälle mit überlappender DAT und DLB Pathologie, sieben sporadische Fälle von DAT, vier Fälle von Parkinson und eine alterskorellierte Kontrollgruppe von sieben Patienten. Die neuropathologische Diagnosestellung erfolgte durch die gebräuchlichen Klassifikationen (CERAD, DLB Consensus Criteria, PD Clinical and neuropathological Criteria). Die verwendeten  $\alpha$ -Synuklein Antikörper beinhalteten die vorbeschriebenen Epitope der NAC Region.

In keinem der hippokampalen Schnitte der sieben DAT Fälle konnte eine positive Markierung von senilen Plaques nachgewiesen werden. Bei den Lewy und Parkinson

Fällen zeigte sich eine starke positive Reaktion auf DLB assoziierte Pathologie aber eine allenfalls als zufällig interpretierte Vergesellschaftung von  $\alpha$ -Synuklein haltigen intrazellulären Inklusionen im Randbereich von neuritischen Plaques. Die Aussagekraft dieser Untersuchungen ist allerdings aufgrund der geringen Patientenzahl nicht eindeutig einschätzbar.

Die vorliegende Versuchsreihe umfasst ein erheblich größeres Untersuchungskollektiv. Die immunhistochemische Reaktivität auf  $\alpha$ -Synuklein wurde bei insgesamt 41 reinen DAT Fällen und elf DLB Fällen, sowie einer zehn Personen umfassenden Kontrollgruppe klinisch nicht dementer Patienten überprüft.

In der Erwartung, eine Beteiligung von  $\alpha$ -Synuklein an senilen Plaques darstellen zu können, ist zur besseren Vergleichbarkeit dieser, gleichzeitig auch bei den anderen fünf gewählten Antikörperfärbungen, eine semiquantitative Abschätzung der Plaquedichte nach dem oben erläuterten Prinzip durchgeführt worden. Insgesamt zeigten sich in den fünf übrigen immunhistochemischen Versuchsreihen ein deutliches Vorkommen für AT8, Tau,  $\beta$ -Amyloid und Ubiquitin positive Plaquestrukturen. Auch in der ChromograninA Immunhistologie war zwar insgesamt bei weniger Präparaten, aber immerhin noch in 80 von 107 gesichteten Schnitten, eine Plauepathologie über eine Fläche von mehr als 5% der grauen Substanz nachgewiesen worden.

Entgegen den Berichten, dass gegen  $\alpha$ -Synuklein gerichtete Antikörper einen großen Anteil von Alzheimerschen Plaques markieren [Iwai et al. 1995, Masliah et al. 1996, Takeda et al. II 1998], konnte in der  $\alpha$ -Synuklein Immunhistologie in keinem der 107 mikroskopisch ausgewerteten Präparate das Vorkommen von immunreaktiven  $\alpha$ -Synuklein positiven Plauestrukturen verifiziert werden, obwohl durch die Überprüfung mittels der übrigen immunhistochemischen Färbungen das grundsätzliche Vorhandensein von Plauestrukturen qualitativ und quantitativ gesichert ist (siehe hierzu Abb.5.1 a-f, 5.2 a-f, 5.3 a-f, 5.4 a-f).

Da auch bei den DLB Fällen und den Fällen der Kontrollgruppe eine Plauepathologie als Einschlußkriterium vorausgesetzt wurde, wurde dasselbe Verfahren auch bei diesen Kollektiven angewendet. Die vorausgehenden Ergebnisse bestätigend konnte auch in den 31 untersuchten DLB Schnitten und 30 untersuchten Schnitten kognitiv normaler alter Patienten keine  $\alpha$ -Synuklein positive Plauepathologie detektiert werden.

Es konnte im vorliegenden Untersuchungskollektiv also insgesamt in sämtlichen Fällen in der  $\alpha$ -Synuklein Immunhistologie keine markierten senilen Plaques nachgewiesen werden.

In einem zweiten Schritt wurde zur Verifizierung eine genauere Überprüfung der 107 in der  $\alpha$ -Synuklein Immunhistologie gefärbten Schnitte vorgenommen. Da Ubiquitin sowohl in Lewy Körperchen als auch in senilen Plaques vorkommt, wurden detektierte,  $\alpha$ -Synuklein markierte Stellen zur besseren Differenzierung auch in der Ubiquitin Immunhistologie überprüft, sowie zusätzlich, zur eindeutigen Klassifizierung und dem Nachweis einer Beteiligung an senilen Plaques, noch in der  $\beta$ -Amyloid Immunhisto-chemie betrachtet.

Von den übrigen 41 DAT Fällen konnte bei sieben Fällen auf Schnitten verschiedener Lokalisation eine umschriebene  $\alpha$ -Synuklein Positivität dargestellt werden. Bei drei der Fälle handelte es sich hierbei um isokortikale, einzelne, intraneuronale Einschlüsse. Alle drei Stellen waren sowohl für  $\beta$ -Amyloid als auch für Ubiquitin negativ. Auf Grund der intraneuronalen Lokalisation ist die Beteiligung an einem Amyloid core ausgeschlossen, da es sich hierbei um extrazelluläre Ablagerungen von Amyloid handelt. Die negative Immunhistologie für  $\beta$ -Amyloid und Ubiquitin in der unmittelbaren Umgebung lässt die Bewertung der intraneuronalen Strukturen als Inklusionen in den dystrophen Neuriten von Randgebieten seniler Plaques ebenso unwahrscheinlich erscheinen, wie die Interpretation der Strukturen als Lewy Körperchen oder Lewy Neuriten.

In weiteren drei DAT Fällen, konnten sowohl isokortikal, als auch allokortikal eine geringe Zahl von extrazellulär gelegenen, diffusen perivasalen, schwach  $\alpha$ -Synuklein positiven Markierungen nachgewiesen werden. Diese waren immunhistochemisch ebenfalls sowohl für  $\beta$ -Amyloid als auch für Ubiquitin negativ. Das Vorkommen von  $\alpha$ -Synuklein in Gefäßen mit zerebraler Amyloid Angiopathie ist beschrieben [Takeda et al. 2000], ebenso wie das Vorkommen von  $\alpha$ -Synuklein in den Endothelzellen von Hirngefäßen und anderen Gefäßen, zumindest unter in-vitro Bedingungen, nachgewiesen ist [Tamo et al. 2002, Wakako et al. 2002]. Ein einziger Fall schließlich zeigte eine solitäre, eindeutig intraneuronale  $\alpha$ -Synuklein positive Struktur, die in einem Bereich gelegen war, in dem sich in der  $\beta$ -Amyloid Immunhistochemie einige senile Plaques zeigen. Betrachtet man die restlichen Ergebnisse in Synopsis, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass es sich in diesem Fall um ein eher zufälliges Zusammentreffen von  $\beta$ -Amyloid und  $\alpha$ -Synuklein Pathologie

handelt, zumal die NAC Komponente der senilen Plaques an sich, Teil einer extrazellulär gelegenen Struktur ist.

Weder in den DLB Fällen, noch in den Fällen klinisch unauffälliger Patienten >50 Jahre ergab sich ein Hinweis auf  $\alpha$ -Synuklein positive Plaquestrukturen. Die  $\alpha$ -Synuklein Immunhistologie färbte zwar in den DLB Fällen zahlreiche kortikale Lewy Körperchen und vereinzelte Lewy Neuriten an, jedoch konnte eine Immunreaktivität in senilen Plaques nicht nachgewiesen werden. In den Fällen der Kontrollgruppe war in keinem Fall  $\alpha$ -Synuklein-positive Ablagerungen ersichtlich.

Die Inkubation der Serienschritte mit  $\alpha$ -Synuklein Antikörpern und  $\beta$ -Amyloid Antikörpern folgte unmittelbar aufeinander, um so eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten und falsch negative Ergebnisse aufgrund von Schnittartefakten bestmöglich auszuschließen. Für den in dieser Studie verwendeten  $\alpha$ -Synuklein Antikörper ist eine Immunreaktivität für das NAC Fragment nachgewiesen [DAKO Produktinformation, 21.03.2008, 27.03.2008].

Als Schlußfolgerung kann demnach festgehalten werden, dass sich, auch in einem größeren Kollektiv von DAT-Fällen, DLB-Fällen und NDEP-Fällen, immunhistologisch kein Anhalt für das Vorhandensein von  $\alpha$ -Synuklein als Komponente von senilen Plaques ergeben hat.

Aus den bisher beschriebenen Untersuchungen ließen sich bislang keine Schlüsse auf den Stellenwert der Alzheimer Pathologie in DLB Fällen ziehen. Eventuelle immunhistochemische Unterschiede der Plauepathologie in allen drei untersuchten Gruppen konnten hiermit nicht dargestellt werden. Die bis zu diesem Zeitpunkt gefundenen Ergebnisse in unserem Kollektiv lassen jedoch zumindest das Vorhandensein von  $\alpha$ -Synuklein als Gemeinsamkeit der Alzheimer Pathologie bei DAT-Fällen und DLB-Fällen ausscheiden.

Für die genauere Untersuchung der immunhistochemischen Markierungsmuster der bei der DLB vorhandenen senilen Plaques und der Plauepathologie in klinisch unauffälligen Gehirnen wurde, wie bereits angedeutet, vorweg ebenfalls eine semiquantitative Einschätzung der in den jeweiligen Antikörperfärbungen vorhandenen Plauedichte vorgenommen. Wie schon erwähnt, waren alle DLB-Fälle und Kontrollgruppenfälle für  $\alpha$ -Synuklein negativ, dementsprechend wird im Folgenden nur noch von den übrigen fünf AK Tau, AT8, Ubiquitin und ChromograninA gesprochen. Die Plauedichten für diese Antikörper sind im Ergebnisteil einzeln in Tabellen dargestellt. Folgende Erkenntnisse lassen sich daraus in Bezug auf die Plauedichte bei diesen beiden Kollektiven ziehen

In frontalen Schnitten von DLB Patienten sind bei drei der durchgeführten fünf Immunhistologien, den Tau-, ChromograninA- und Ubiquitin- Färbungen, Häufigkeitsgipfel in der Gruppe der zu 2+ positiv markierten Präparate zu finden. In der AT-8 Immunhistologie sind die Plaques etwas weniger dicht markiert, im Gegensatz zu der  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie, dort sind die meisten Schnitte erwartungsgemäß sogar zu 4+ positiv markiert.

Bei den Kontrollfällen ließen sich in frontalen Schnitten keine AT8 und Tau positiv markierten senilen Plaques detektieren, in den verbleibenden drei Immunhistologien zeigten sich jeweils in neun von zehn Ubiquitin bzw ChromograninA Schnitten Plaques, die in ihrer Gesamtheit jedoch in keinem Präparat mehr als 2+ (25%) der grauen Substanz betrafen. In der  $\beta$ -Amyloid Färbung waren in jedem Schnitt Plaques markiert, die Hälfte der Schnitte war zu über 2+(25%) mit Plaques bedeckt.

Für die frontalen Schnitte lässt sich also zusammenfassen, dass die größten Plaquedichten jeweils natürlich in der  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie gefunden wurden, dieses Ergebnis bestätigt nur die These, dass es sich in beiden Fällen um senile Plaques handelt [Deramecourt et al. 2006]. Davon ausgehend ist festzustellen, dass Ubiquitin und ChromograninA-Positivität bei einer Mehrheit der senilen Plaques ebenfalls in beiden Fällen vorhanden ist. AT8 und Tau positive Plaques scheinen bei den Kontrollfällen frontal im Gegensatz zu den DLB Fällen nicht nur weniger häufig, sondern selten zu sein, da sie hier nicht nachgewiesen werden konnten. (siehe hierzu Abb.5.6 a-e, 5.7a-e). Für genauere Aussagen ist das untersuchte Kollektiv allerdings zu klein.

In der Hippokampusregion sind alle Präparate, bis auf die  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie, größtenteils in einem Bereich von 2+ zusammengefasst. Die  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie weist in sechs von elf untersuchten Präparaten eine Plaquedichte von 3+ auf, die  $\beta$ -Amyloid Pathologie in den Kontrollfällen verhält sich analog. Auffällig ist bei den Kontrollfällen hippokampal mehrheitlich wieder eine fehlende Plaquemarkierung in Tau und AT8 Immunhistochemie, während ebenso wie bei den DLB Fällen die Mehrheit der senilen Plaques auch Ubiquitin und ChromograninA positiv ist. Hier findet sich nur jeweils ein negativer Schnitt von zehn. Auch hier scheint also bei den Kontrollfällen eine Tau/PHF-Tau Pathologie eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In den ausgewerteten okzipitalen Schnitten von DLB Patienten verhält sich die Plaquedichte Verteilung ähnlich wie in den beiden anderen Lokalisationen.  $\beta$ -

Amyloid Immunhistologie, Ubiquitin und ChromograninA Immunhistologie sind größtenteils zu mehr als 1+(5%) positiv markiert, in der Tau und AT8 Immunhistologie befinden sich die meisten Präparate unter diesem Prozentsatz. Die Kontrollgruppe reagiert in Ihrer Plaqueverteilung vergleichbar.

Was die Dichte der senilen Plaques betrifft, unterscheiden sich die beiden Kollektive in ihrer Tendenz nicht eindeutig. In beiden Kollektiven überwiegt eindeutig die Zahl der zu über 1+(5%) ChromograninA+ senilen Plaques mit 81% (N=31 DLB), bzw 47% (N=30 NDEP) die der AT8 immunreaktiven senilen Plaques mit 29% (N=31 DLB), bzw. 13% (N=30 NDEP).

Schaut man sich die regionale Verteilung der senilen Plaques an, so fällt auf, dass sich bei den von uns untersuchten Präparaten die höchsten Plaquedichten, sowohl bei den DLB Fällen, als auch bei den Fällen klinisch gesunder Patienten, Zumindest annähernd so oft, wenn nicht sogar etwas öfter nicht nur im Neokortex, sondern auch in allokortikalen Bereichen findet. Dies scheint zumindest ein etwas ungewöhnlicher Befund zu sein, da in der Literatur vermerkt ist, dass die Plaques in Gehirnen von nicht dementen Patienten häufig mehr im neokortikalen Bereichen zu finden sind [Schmitt et al. 2000]. Allerdings ist das hier untersuchte Kollektiv zu klein, um diesen Ergebnissen eindeutig zu widersprechen. Es scheint jedoch zumindest eine größere Variationsbreite bezüglich der Plaqueverteilung in Gehirnen klinisch nicht dementer Patienten zu geben als bisher vermutet.

Weiterhin wurden auch Untersuchungen zum immunhistologischen Markierungsmuster der individuellen senilen Plaques durchgeführt. Damit soll überprüft werden, ob z. B. bestimmte Antigenstrukturen in einem senilen Plaque kombiniert miteinander auftreten oder ob bestimmte Markierungsmuster in den einzelnen klinischen Gruppen überwiegen.

So wird in der Literatur berichtet, dass in NDEP Gehirnen ein AT-8 negativer, Ubiquitin und ChromograninA positiver Plaquetyp überwiegt [Ellison et al. 2004]. Um hier genaue Aussagen über die Immunreaktivität der einzelnen Plaques treffen zu können, sind diese, jeweils im direkten Vergleich, auf ihre Immunreaktivität hin untersucht worden.

Bei den DLB Fällen konnten nur 17 mit dem monoklonalen AT8 AK positiv markierte senile Plaques in 31 Schnitten zur genaueren Untersuchung gefunden werden, wohingegen 53 Plaques in der ChromograninA Immunhistologie untersucht werden konnten, was bei der hier deutlich geringeren Dichte AT8-positiver seniler Plaques zu erwarten war.

Die AT8-immunreaktiven senilen Plaques (N=17) waren zu gleichen Teilen mit jeweils 35%(6) AT8+ A $\beta$ +Ubi+ Chromo- und Ubi- Chromo- Plaques. Beide Typen seniler Plaques, sowohl die AT8+ A $\beta$ + Ubi+ Chromo- Plaques mit vier von sechs, als auch die AT8+ A $\beta$ +Ubi- Chromo- Plaques mit fünf von sechs Plaques scheinen tendenziell häufiger diffus zu sein. An zweiter Stelle standen die für AT8+ A $\beta$ +Ubi+ Chromo+ Plaques, eine eindeutige Morphologie ließ sich hier nicht zuordnen.

Die meisten für AT8 positiven Plaques scheinen bei der DLB also für Chromogranin negativ (70%) zu sein, wobei aber grundsätzlich auch ChromograninA positive Plaques mit AT8 Komponente vorkommen (30%).

Die ChromograninA positiven Plaques (N=53) an sich sind in ihrer Gesamtheit mit 68% (36) AT8-negativ, also AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaques. Das Vorkommen von AT8+ A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaques nimmt auch hier mit 23%(12) ChromograninA positiven Plaques die zweite Stelle ein. Es ist also davon auszugehen, dass insgesamt gesehen der AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaque der vorherrschende Plaquetyp bei den untersuchten DLB Fällen ist, direkt gefolgt von dem AT8+ A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaque.

Morphologisch waren die meisten der ausgewerteten Plaques hier mit 57% (30) diffusen, sowie 42%(22) Plaques vom klassischen Typ ähnlich verteilt. Anteilsmäßig waren die meisten der diffusen Plaques mit 70%(N=30) AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaques. Auch die meisten der klassischen Plaques, nämlich 68%(N=22) waren AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaques.

In den zehn Kontrollfällen konnten nur zehn AT8 positive Plaques zur weiteren Klassifizierung ihrer Immunreaktivität markiert werden. Jeweils vier(40%) davon waren AT8+ A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ bzw. AT8+ A $\beta$ + Ubi+ Chromo- Plaques, zehn von zehn Plaques(100%) waren morphologisch diffus konfiguriert.

In der ChromograninA Immunhistologie konnten mit großer Regelmäßigkeit markierte Plaques gefunden werden, insgesamt konnten 35 senile Plaques mit ChromograninA positiver Komponente zur näheren Untersuchung gefunden werden. Diese Plaques waren zum größten Teil, nämlich zu 86%, immunohistochemisch gesehen AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaques. Geht man hier nur auf AT8 und ChromograninA ein, dann sind alle ChromoA-positiven Fälle AT8-negativ. Angesichts dieser Typisierung wird deutlich warum, trotz einem - gemessen an der  $\beta$ -Amyloid Immunhistologie - reichlichen Vor-kommen von Plaques in diesem Kollektiv, in der AT8 Immunhistologie kaum Positivität ausgemacht werden konnte. Offenbar spielt

das hyperphosphorylierte Tau Protein bei physiologisch gealterten Patienten eher eine untergeordnete Rolle.

Auch hier lässt die morphologische Einteilung dieser Plaques keine Rückschlüsse auf den immunhistologischen Phänotyp zu. Die meisten der ausgewerteten Plaques sind zwar mit 71% (N=35) dem diffusen Typ zuzuordnen, allerdings kommen mit 29% (N=35) auch größere Anteile von klassischen konfigurierten Plaques vor.

Ausgehend von der ursprünglichen Fragestellung bleibt nun zusammenfassend zu klären, was ist der Plauepathologie dieser beiden ausgewerteten Kollektive, von DLB Patienten und klinisch nicht dementen Patienten, auf immunhistologischer Ebene gemeinsam?

Der Vergleich des immunhistologischen Markierungsmusters der senilen Plaques bei DLB und dem Kontrollkollektiv ergab also:

In beiden Kollektiven, sowohl dem DLB Kollektiv als auch im Kollektiv klinisch gesunder Patienten, konnten erheblich weniger AT8 positive Plaques als ChromograninA positive Plaques gefunden werden. Insgesamt war eine Mehrheit der Plaques immunhistochemisch dem AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaque zuzuordnen. Bei den Fällen klinisch gesunder Patienten war sogar keiner der gefundenen ChromograninA positiven Plaques AT8 positiv.

Dieser AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaque ist als Nebenbefund in einer Studie über DAT Gehirne beschrieben [Yashuhara et al. 1994]. Hier werden zwei vorherrschende Plaquetypen, die in Gehirnen von Alzheimerpatienten und normal gealterten Gehirnen immunhistochemisch zu differenzieren sind, erwähnt: Typ I zeigt positive Reaktionen für Antikörper gegen hyperphosphoryliertes Tau, das A $\beta$ -Peptid sowie Ubiquitin. Typ II ist immunopositiv für Antikörper gegen ChromograninA, das A $\beta$ -Peptid und Ubiquitin, aber nicht für hyperphosphoryliertes Tau. In Alzheimergehirnen ist eine Mischung beider Typen zu finden, in den Gehirnen physiologisch gealterter Patienten mit Plaques scheinen Typ II Plaques zu dominieren. Diese Erkenntnisse werden dahingehend interpretiert, dass die senilen Plaques vom Typ II als benigne anzusehen sind. An anderer Stelle wird vermutet, dass dieser AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaque, den dominanten Plaque in Gehirnen normal gealterter Patienten über 50 darstellt, somit also bei der DAT eher die Ausnahme ist [Ellison et al. 2004]. Ähnliche Ergebnisse, nämlich eine Population von Tau Protein negativen, ChromograninA positiven Plaques in neokortikalen Bereichen von klinisch nicht dementen älteren Personen wurden 1995 durch Wang und Munoz [Wang et Munoz

1995] beschrieben. Das untersuchte Kollektiv umfasste hier sechs klinisch gesunde Menschen über 79 Jahre.

Das uns zur Verfügung stehende DAT Kollektiv der vorliegenden Studie wurde, wie bereits erwähnt, mit derselben Methode wie die DLB Fälle und das Kontrollkollektiv, von einem anderen Mitglied unserer Forschungsgruppe auf das immunhistochemische Verhalten der ChromograninA positiven Plaques untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass der größte Teil der Plauepathologie bei der DAT durch den AT8+A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaque bestritten wird, der AT8- A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaque stellte jedoch hier keine Seltenheit dar, sondern war der zweithäufigste immunhistochemische Phänotyp unter den ChromograninA positiven Plaques. [Jünemann et al. 2008] Die Plauepathologie bei der DLB ähnelt somit qualitativ eher den Plaques, die in den Gehirnen klinisch nicht dementer Menschen, oder aufgefunden werden. Allerdings kommen auch die AT8+A $\beta$ + Ubi+ Chromo+ Plaques, die beim Morbus Alzheimer besonders ausgeprägt zu sein scheinen, grundsätzlich bei dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv der DLB vor. Zusammenhänge in der Pathogenese von Lewy Körperchen und Alzheimer assoziierter Pathologie sind nicht geklärt.

Es wird allerdings vermutet, dass der Prozess der Bildung von Lewy Körperchen zumindest teilweise von bestehender Alzheimer Pathologie gebahnt wird [Iseki et al. 2003, Ishizawa et al. 2003]. Über die genauen Mechanismen herrscht Unstimmigkeit. Es wird vor allem kontrovers diskutiert, ob dies über eine Interaktion zwischen  $\alpha$ -Syn und Tau oder  $\alpha$ -Syn und  $\beta$ -Amyloid zu interpretieren ist. So existieren Studien die eine Triggerung der Lewy-Körperchen Bildung durch die Interaktion von  $\alpha$ -Synuklein und Tau im menschlichen Gehirn [Galpern et al. 2006, Wenning et al. 2005], in transgenen Tier- [Maries et al. 2003] sowie In-vitro-Modellen beweisen [Geddes et al. 2005, Giasson et al. 2003]. Gleichzeitig bestehen Hinweise dass Beziehungen zwischen kortikaler Amyloid und  $\alpha$ -Synuklein Pathologie im menschlichen Gehirn [Lashley et al. 2008, Mikolaenko et al. 2005] sowie im Mäusemodell [Lewis et al. 2001, Masliah et al. 2001] bestehen. Andere beschreiben einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Dichte an neuritischen Plaques und dem Ausmaß der  $\alpha$ -Synuklein Pathologie [Jellinger und Attems 2008].

Die mit dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse lassen keinen direkten Zusammenhang zwischen der Tau Pathologie und der Entstehung von Lewy Körperchen, bzw. der Beteiligung an der  $\alpha$ -Synuklein Pathologie ersichtlich werden. Im Gegenteil konnte zwar  $\alpha$ -Synuklein Pathologie mit großer Regelmäßigkeit in den

untersuchten DLB Fällen nachgewiesen werden, Tau Pathologie in Form von Tau Positivität in senilen Plaques, war zumindest in dem hier untersuchten Kollektiv nicht sehr stark ausgeprägt.

Mit großer Regelmäßigkeit konnten jedoch in den ausgewerteten DLB Fällen  $\beta$ -Amyloid enthaltende Plaquestrukturen aufgefunden werden. Ein Befund, der in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Jellinger und Attems, möglicherweise eher eine Triggerung der  $\alpha$ -Synuklein Pathologie durch das Vorhandensein von  $\beta$ -Amyloid nahe legen könnte.

Zusammenfassend kann man auf der Basis der erläuterten Ergebnisse folgern, dass das immunhistologische Markierungsmuster der senilen Plaques, das in Gehirnen DLB kranker Patienten aufgefunden werden kann, dem Markierungsmuster in physiologisch gealterten, bzw. sich möglicherweise in präklinischen Stadien einer Demenz befindlicher Patienten, auf molekularer Ebene erheblich mehr gleicht, als der in DAT Gehirnen. Es liegt demnach nahe zu vermuten, dass die Alzheimer Pathologie bei der DLB, zumindest was die Plauepathologie betrifft, eher eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die klinischen Symptome dieses Krankheitsbildes spielt. Studien über Untersuchungen an Parkinson Gehirnen und DLB Gehirnen berichten, dass hier die Lewy Körperchen Dichte in parahippokampalen Bereichen eine stärkere Korrelation zu einer klinischen Demenz zeigt, als neuritische Plaques [Harding et al. 2001].

Dennoch gleichen sich die von uns untersuchten Plaques der beiden Kollektive DLB Kranker und physiologisch gealterter Gehirne eben nicht vollkommen. Bei der DLB lässt sich nicht nur eine um einiges stärker ausgeprägte Tau Pathologie nachweisen, sondern auch der Anteil morphologisch klassischer Plaques ist größer als in den Gehirnen physiologisch gealterter Patienten. Die Alzheimer assoziierte Pathologie bei der DLB scheint also mehr als nur ein Epiphänomen im Sinne eines begleitenden physiologischen Alterungsprozesses zu sein.

Teile dieser Arbeit wurden in zwei Posterbeiträgen auf der 53. DGNN Jahrestagung am 09.-11. Oktober 2008 in Würzburg veröffentlicht und als Abstract in der Acta Neuropathologica Vol 116 N.3 S. 342 September 2008 publiziert. Das Poster zu dieser Arbeit wurde mit dem Posterpreis für klinische Neuropathologie der DGNN ausgezeichnet.

### **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



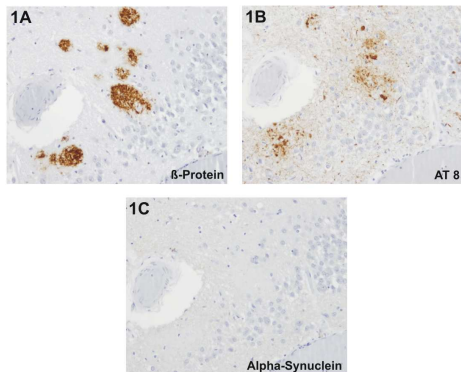
D.-A. Eschbach<sup>1</sup>, M. B. Jünemann<sup>1</sup>, K. da Silva<sup>1</sup>, K. Kuchelmeister<sup>1,2</sup>

<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

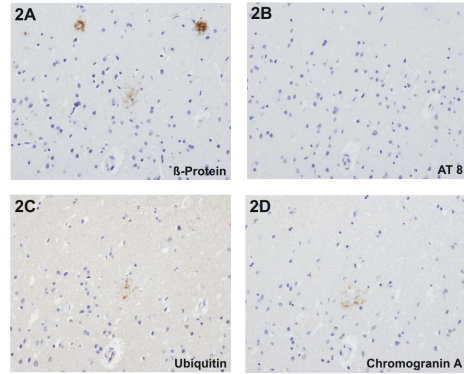
Wir haben Paraffinschnitte von 41 Gehirnen mit AD (klinische Angaben über dementielles Syndrom plus passende Neuropathologie, Obduktionszeitraum von 21 Jahren), von 11 Gehirnen mit DLB und von 10 Gehirnen alterskorrelierter NDEP mit  $\beta$ -Protein-positiven SP in Serienschnitten von jeweils 3 Paraffinblöcken (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

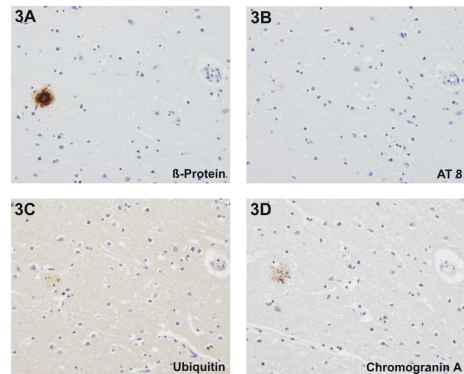
In allen AD-Fällen lag keine  $\alpha$ -Synuclein-Immunreaktivität in den SP vor (**Abb. 1A-C**). Auch in den DLB- und den NDEP-Fällen war keine  $\alpha$ -Synuclein-Immunreaktivität in den SP nachzuweisen.

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.

## **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



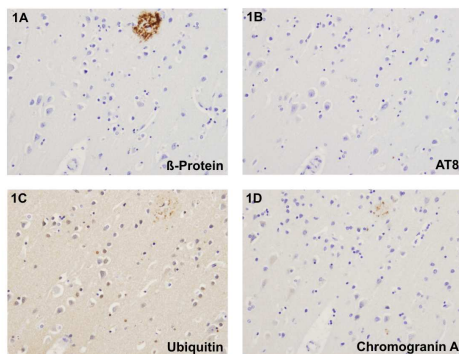
### Einleitung

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:

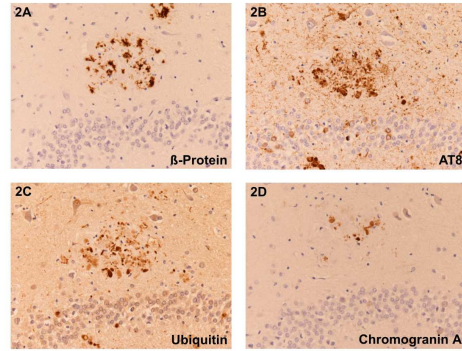
Bei einer semiquantitativen Auswertung der Dichte immunreaktiver SP mit den verschiedenen Antikörpern, zeigte sich, dass ein großer Teil der  $\beta$ -Protein-positiven SP bei NDEP auch eine Chromogranin A- und Ubiquitin-Immunreaktivität aufwies. Es fanden sich hier aber nur sehr selten AT8-immunreaktive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

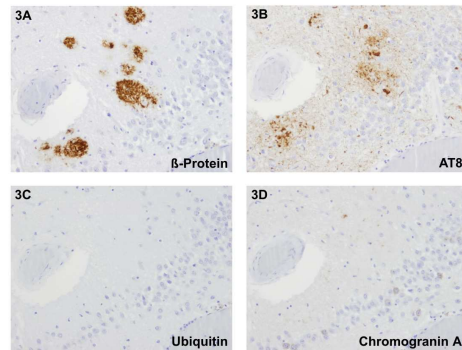
#### AD:

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.

## 4.3 Zusammenfassung

### **Immunhistologische Charakteristika seniler Plaques unter besonderer Berücksichtigung der Alpha-Synuclein- Immunhistologie**

Eine vergleichende neuropathologische Autopsiestudie bei M. Alzheimer, Demenz mit Lewy-Körpern und nicht-dementen alten Menschen

Diese Arbeit vergleicht immunhistochemisch die Zusammensetzung der Plaquepathologie bei der Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) der Alzheimerschen Erkrankung (DAT) und einer Gruppe von nicht dementen älteren Menschen (NDEP) in Hinblick auf mögliche Zusammenhänge in der Pathogenese.

Es gibt Autoren, die in der NAC Komponente von Alzheimerschen Plaques einen Teil des  $\alpha$ - Synuklein Proteins nachgewiesen haben, welches den Hauptbestandteil der Lewy-Körperchen bei der DLB darstellt. Dieses Ergebnis scheint nicht beliebig reproduzierbar zu sein.

Desweiteren ist kaum beschrieben inwieweit sich die Plaquepathologie natürlich gealterter Menschen und solcher mit einer DLB immunhistochemisch gleichen.

Das hier verwendete Patientenkollektiv umfasst 41 DAT Fälle, 11 DLB Fälle und eine 10 Fälle umfassende Kontrollgruppe NDEP in vergleichbarem Alter. Die DAT Fälle wurden auf das Vorhandensein von  $\alpha$ - Synuklein Pathologie untersucht, die DLB und NDEP Fälle bezüglich der immunhistochemischen Reaktivität der Plaque Pathologie für Antikörper gegen Tau-Protein,  $\beta$ -Protein, Ubiquitin und ChromograninA verglichen.

Entgegen den Berichten, dass gegen  $\alpha$ - Synuklein gerichtete Antikörper einen großen Anteil von Alzheimerschen Plaques markieren, konnte in der  $\alpha$ - Synuklein Immunhistologie in keinem der 107 mikroskopisch ausgewerteten DAT Präparate eine Markierung nachgewiesen werden, obwohl durch die Überprüfung mittels der anderen immunhistochemischen Färbungen das grundsätzliche Vorhandensein von senilen Plaques qualitativ und quantitativ als gesichert gelten kann. Es ergibt sich somit kein Anhalt für das regelhafte Vorhandensein von  $\alpha$ - Synuklein als Komponente seniler Plaques.

In den untersuchten DLB- Fällen sind 36 von 53 ChromograninA positiven Plaques Ubiquitin positiv und AT8- negativ, was einem Anteil von 67,9% entspricht. Plaques die Tau-Pathologie ebenso wie ChromograninA- Komponenten, oder nur Tau Pathologie aufweisen, stellen einen wesentlich geringeren Anteil dar. In den NDEP

Gehirnen sind von 35 untersuchten ChromograninA positiven Plaques 30 ebenfalls für Ubiquitin positiv, Tau Pathologie ist in keinem dieser Plaques nachweisbar. Ein Vergleich mit den anderen Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe lässt den Schluss zu, dass senile Plaques in der DLB eine größere Verwandtschaft zu Plaques in Gehirnen natürlich gealterter Patienten als zu senilen Plaques der AD aufweisen.

## 4.4 Abstract

### Similarities in pathogenesis of Alzheimer's disease and Dementia with Lewy Bodies

D.-A. Eschbach, University of Giessen

Including the dementia with Lewy Bodies (DLB), there is a varying number of synukleinopathies described. Literature remains controversial about the appearance of  $\alpha$ -synuclein positive structures in Alzheimer's disease (AD) plaques, particularly in the NAC of AD plaques. However AD associated pathology is a frequent finding in sections of DLB brains and seems to occur as well in brains of normal elderly human beings. The immunohistological structure of plaque pathology in these three cases is barely described.

The present study determines the finding of  $\alpha$ -synuclein pathology in 41 proved AD brains on the one hand, and the immunohistochemical consensus of plaque pathology in 11 DLB, 41 AD and 10 cognitive unimpaired elderly brains on the other hand.

For Immunohistochemical staining we used antibodies against hyperphosphorylated tau protein,  $\alpha$ -synucleine,  $\beta$ -proteine, ubiquitine, and chromograninA.

In opposition to existent reports, we could not provide evidence of  $\alpha$ -synuclein in any of the 107 realised microscopic analyses, although the occurrence of plaque deposits could be confirmed by using other types of immunohistological staining.

Concerning the immunohistochemical consensus between the three analysed groups, we found out that the molecular configuration of plaque pathology in DLB brains seems to be remarkable more similar to plaques in cognitive unimpaired brains than to brains, belonging to cases of AD. The most frequent Plaque Type in DLB and NDEP brains showed to be the tau negative,  $\beta$ -protein, ubiquitine, and ChromograninA positive Plaque Type.

The plaque type proved most frequent in AD, the tau positive,  $\beta$ -proteine, ubiquitine, and ChromograninA positive Plaque Type seems to appear also in cases of the other groups, but in considerably lower count. At least the pathogenetically relationship between AD and DLB remains vaguely.



## 5 Anhang

### 5.1 Fallkollektiv DAT

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. Amyloid-Angiopath
DAT 5	X		82	V/B		
DAT 6	X		79	VI/B		
DAT 7	X		74	VI/B		Zartwandige Hirnbasisart., Geringgrad. Arteriolskler.
DAT 8		X	72	VI/B		Geringgrad. Arterioskler. der Hirnbasisart.
DAT 9	X		85	V/B	HOPS	Mäßiggrad. Arterio- und Arteriolskler.
DAT 10		X	79	VI/B		Geringgrad. Hirnbasisarterienskler., leichte Arteriolskler.
DAT 11		X	88	IV/A	HOPS	Deutliche Hirnbasisarterienskler., deutliche Arteriolskler.
DAT 12		X	83	V/B	HOPS	Hirnarterienskler.
DAT 13	X		87J	VI/B	Frontale Hyperostose	Zarte Hirnbasisart. Amyloid- Angiopath.
DAT 14	X		67	V/C		Zartwandige Hirnbasisart.
DAT 15	X		76	VI/C		Mittelgrad. Hirnbasisarterienstenose Amyloid-Angiopath.
DAT 16	X		84	V/B		
DAT 17	X		76	VI/B		
DAT 18			92	IV/A		Mitellgrad. Arterioskler. Amyloid- Angiopath.
DAT 19		X	78	IV/A		
DAT 20	X		90	IV/A	HOPS	Arterio- Arteriolskler.
DAT 21	X		71	VI/C	Seit 2 Jahren bekannte Demenz	Arteriolskler.
DAT 22		X	81	VI/B		Keine Hirnbasisarterienskler.
DAT 23	X		86	VI/B		Mäßiggrad. Arterio- Arteriolskler.

DAT 24		X	78	IV/A	HOPS	Hochgrad. Hirnbasisarterienskler. deutliche Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 25	X		78	V/B		Geringgrad. Arterioskler. Und hochgrad. Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 26		X	80	IV/A	HOPS	Hochgrad. Arterio- Arterioskler.
DAT 27		X	79	VI/B		Mäßiggrad. Hirnbasisarterienskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 28		X	81	IV/B		Geringgrad. Hirnbasisarterienskler., Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 29	X		75	V/B		Arterioskler., kein Anhalt für Hirnbasisarterienskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 30	X		78	IV/A		Geringe Arterio- und mäßiggrad. Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 31		X	72	IV/B		Mittelgradige Arterio- und Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 32		X	78	V/A		Mittel bis hochgrad. Hirnbasisarterienskler. und deutliche Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 33		X	73	V/C		Leichte bis mäßige Arterioskler., keine Veränderungen der Hirnbasisart.
DAT 34	X		81	V/A		Geringe Hirnbasisarterienskler., deutliche Arterioskler.
DAT 35	X		80	VI/C		Deutliche Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 36	X		75	V/C		Geringe Hirnbasisarterioskler., Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 37		X	75	VI/C		Amyloid-Angiopath.
DAT 38	X		81	VI/B		Mäßiggrad. Hirnbasisarterienskler., geringgrad. Arterioskler. Amyloid-Angiopath.
DAT 39		X	78	V/C		Geringgrad. Arterioskler., Arterioskler.
DAT 40	X		77	VI/C		Mäßiggrad. Arterioskler. deutliche Arterioskler. Amyloid-Angiopath
DAT 41	X		55	VI/C		Amyloid-Angiopath.

Tabelle 6.5.1

## 5.2 Fallkollektiv DLB

Fall	♀	♂	LJ	Braak/ CERAD	Klinik	Pathologie
DLB 1		X	78	V/A	Verdacht auf Pilzpneumonie, Leukenzephalopathie, Soorösophagitis, KHK, Polyneuropathie	Amyloidangiopathie, frontal Hirnfarkt, DLB vom neokortikalen Subtyp
DLB 2	X		79	III/A	Klinische Demenz, Parkinsonismus	DLB vom Hirnstammprädom. Subtyp. Amyloid-Angiopath
DLB 3		X	79	IV/A	Paranoid halluzinatorische Symptomatik, Demenz, Todesursächlich: Rechtsherzversagen aufgrund fulminanter Lungenembolie	DLB vom neokortikalen Subtyp, mäßige Hirnbasisarterienskler., deutliche Arteriolskler.
DLB 4		X	69	V/C	Pneumokokkenpneum., Leberzirrhose, C2 Abusus	DLB vom neokortikalen Subtyp, Amyloid- Angiopathie, deutliche Arteriolskler., Arterioskler., multiple lakunäre Infarkte, Brückenfarkt rechts
DLB 5	X		85	I/A	60% ACI Stenose links, subdurales Hämatom	DLB vom Hirnstamm prädom. Subtyp, Amyloidangiopathie, hochgrad. Arterioskler.
DLB 6		X	65	III/O	Alkoholabusus mit Psychose, bulbäre Symptome, Lewy Körperchen Demenz, Mediainfarkt	DLB vom limbischen Subtyp, geringgrad. Arterioskler., mäßige Arteriolskler.
DLB 7		X	75	V/C	Metast. Larynx Ca., Hirnfarkt	Neokortikaler Subtyp der DLB, mäßige bis hochgrad. Arterioskler.
DLB 8		X	80	IV/B	Lakunäre HirnfarkteMyoklonien, parkinsonoides Gangbild	DLB vom neokortikalen Typ, Amyloidangiopathie, geringe Hirnbasisarterienskler.
DLB 9		X	74	III/O	Inraspinale Blutung unter Marcumartherapie	DLB vom neokortikalen Subtyp, geringe Arterioskler., Arteriolskler.
DLB 10		X	85	III/A	Progredientes Herz Kreislaufversagen	Lewy Körperchen Krankheit vom limbischen Typ, ausgeprägte Amyloid- Angiopathie
DLB 11		X	66	II/B	Schwindel, Gangstrg., optische Halluzin.	Neokortikaler Subtyp der DLB

Tabelle.6.2

### 5.3 Fallkollektiv Kontrollgruppe

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

Tabelle 6.3

### 5.4 Untersuchte Paraffinblöcke

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 29	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,L,T,W,X	
DAT 32	A,J,P,R,S	
DAT 33	B,G,I,J,K	
DAT 34	B,K,N,O,P	
DAT 35	Q,W,N,T,U	
DAT 36	A,Q,M,T,K	
DAT 37	A,J,N,O,L	
DAT 38	B,N,J,P,Q	
DAT 39	A,F,H,J,K	
DAT 40	A,G,E,F,J,K	
DAT 41	A,J,N,K,P,Q	

Nummer	Block	Zusatz
DLB 1	A,E,S,L,M	
DLB 2	B,E,K,M,N	
DLB 3	A,K,T,Q,R	
DLB 4	B,L,T,W,X	
DLB 5	A,M,R,S,T	
DLB 6	A,J,M,Q,R	
DLB 7	A,D,F,G	
DLB 8	A,J,M,Q,R	
DLB 9	A,Q,H,L,M	
DLB 10	A,J,N,P	okzip:fehlt
DLB 11	A,F,G,H,I	

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	

## Plaquedichte und Braak-Stadien im Vergleich

Fall	Form	Braak/ CERAD
KG 1	-	III/0
	-	
	-	
KG 2	-	II/0
	-	
	-	
KG 3	-	III/A
	1+	
	-	
KG 4	-	II/B
	1+	
	1+	
KG 5	-	III/A
	2+	
	1+	
KG 6	-	III/A
	2+	
	1+	
KG 7	-	III/B
	1+	
	-	
KG 8	-	IV/A
	1+	
	1+	
KG 9	-	III/0
	-	
	-	
KG 10	-	VI/0
	-	
	-	

## 5.5 Bilder

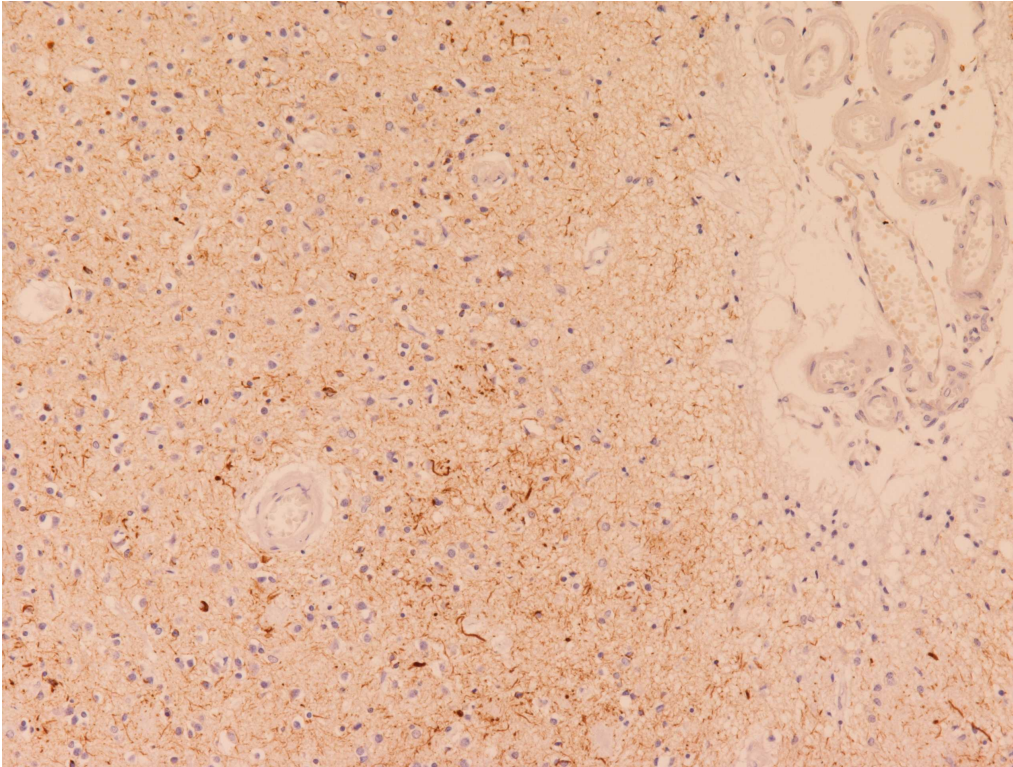


Abbildung 5.1a: Tau-Protein AK

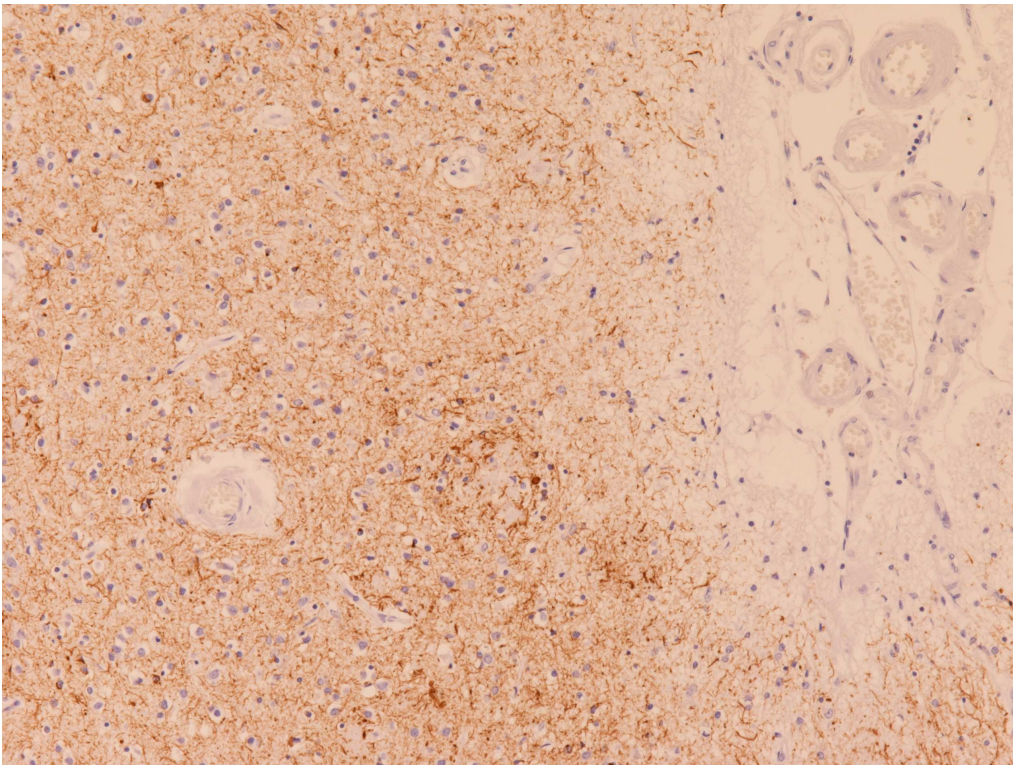


Abbildung DAT 5.1b: AT-8 AK

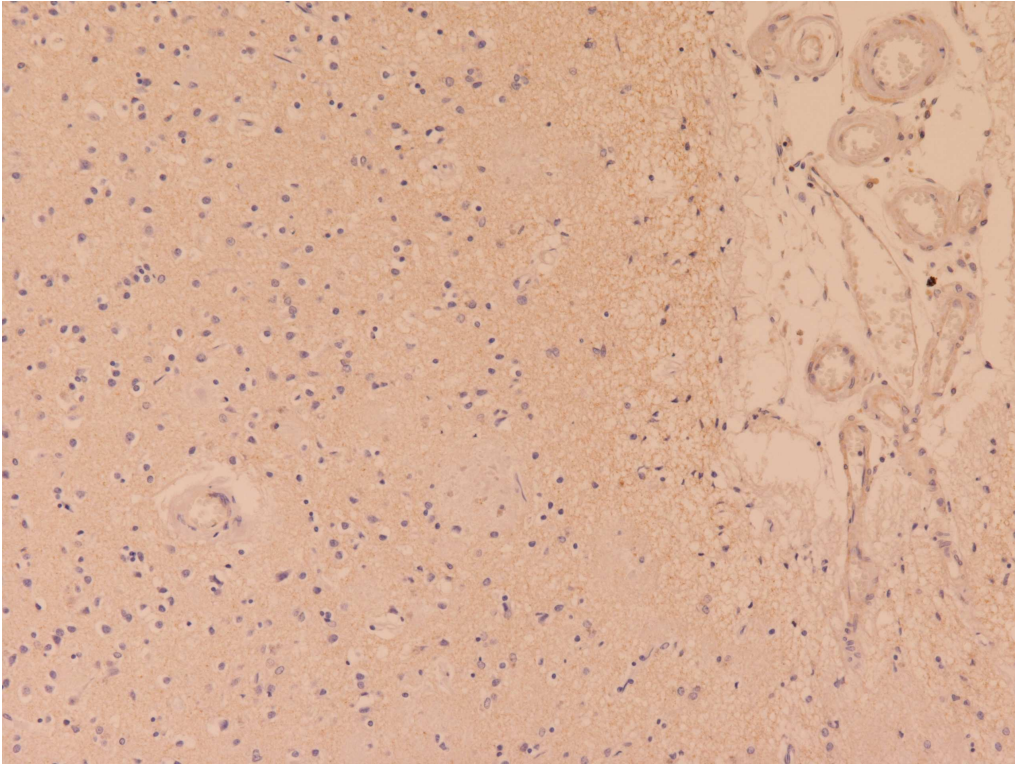


Abbildung DAT 5.1c:  $\alpha$ -Syn AK

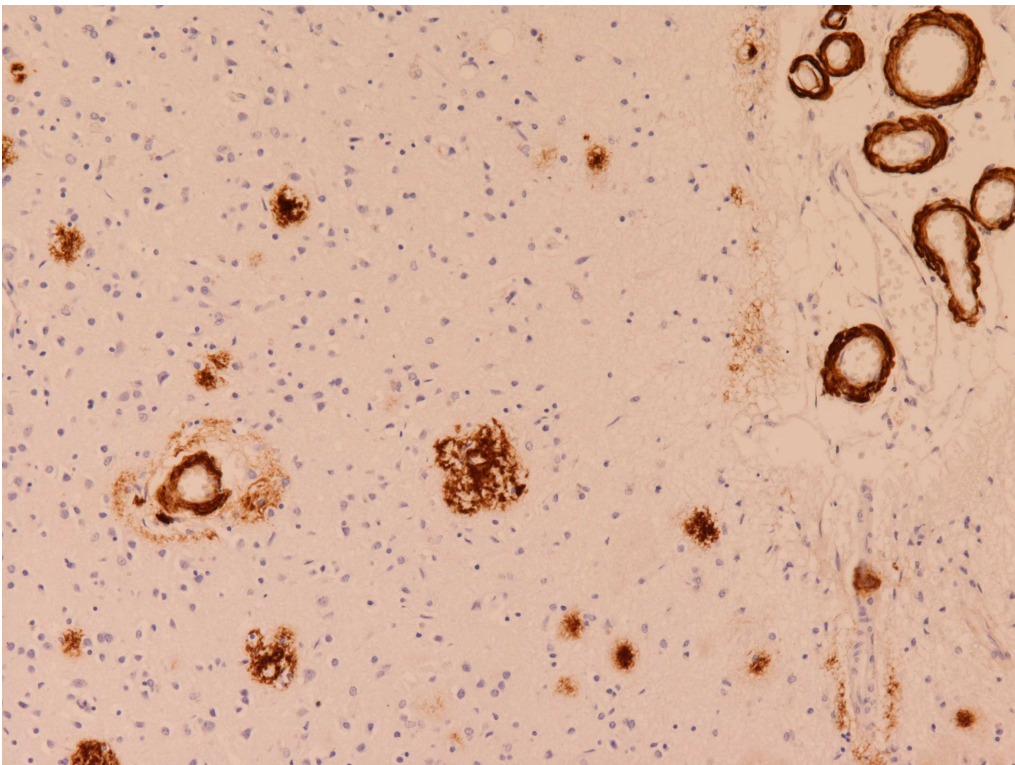


Abbildung 5.1d: DAT  $\beta$ -Amyloid AK

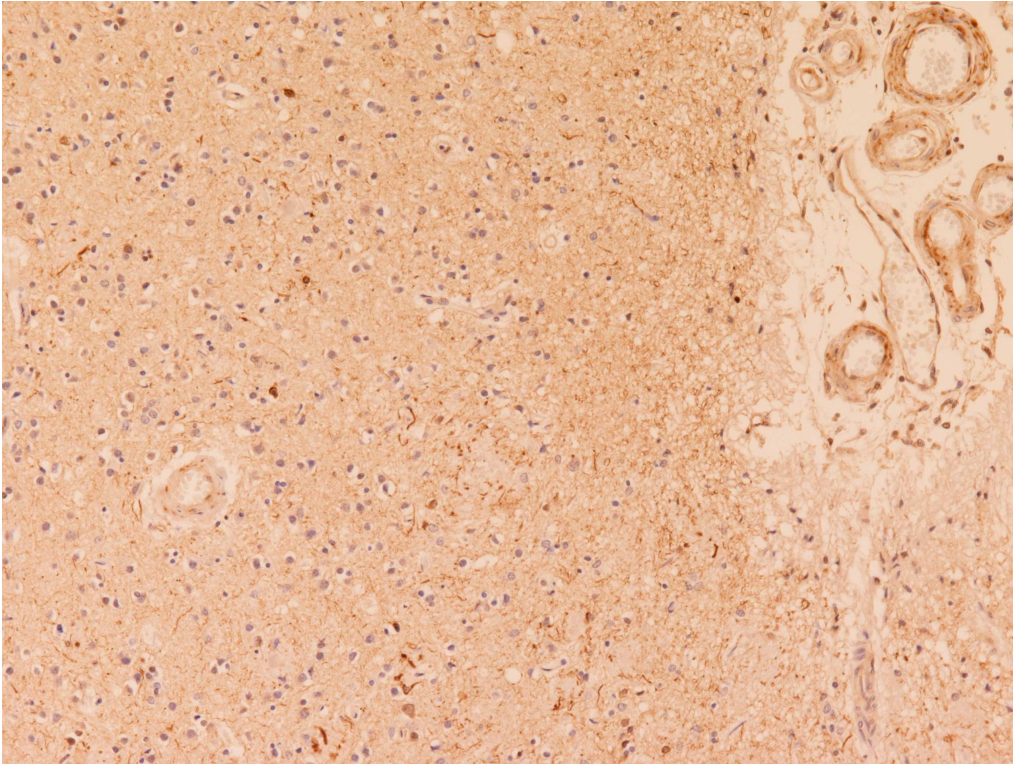


Abbildung DAT 5.1e: Ubiquitin AK

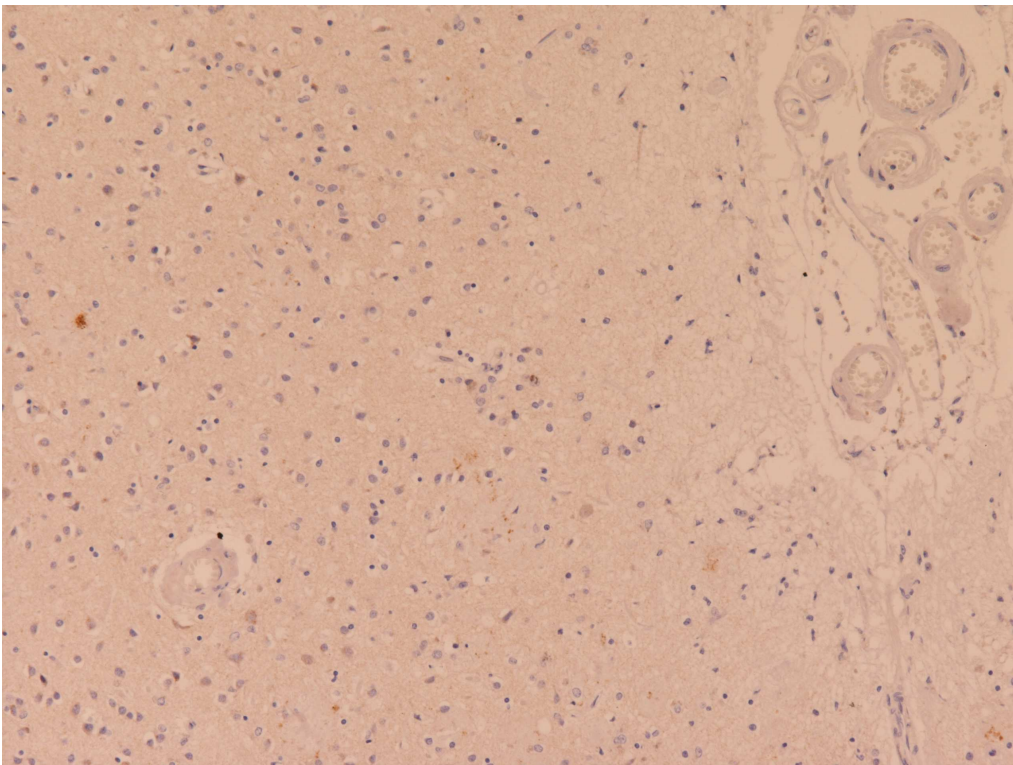


Abbildung 5.1f: DAT ChromograninA AK

Abb.5.1a-5.1f: Darstellung eines AT8 +, Tau+,  $\alpha$ -Syn-,  $\beta$ -Protein+, Ubiquitin+, ChromograninA+ Plaques aus dem DAT Kollektiv.

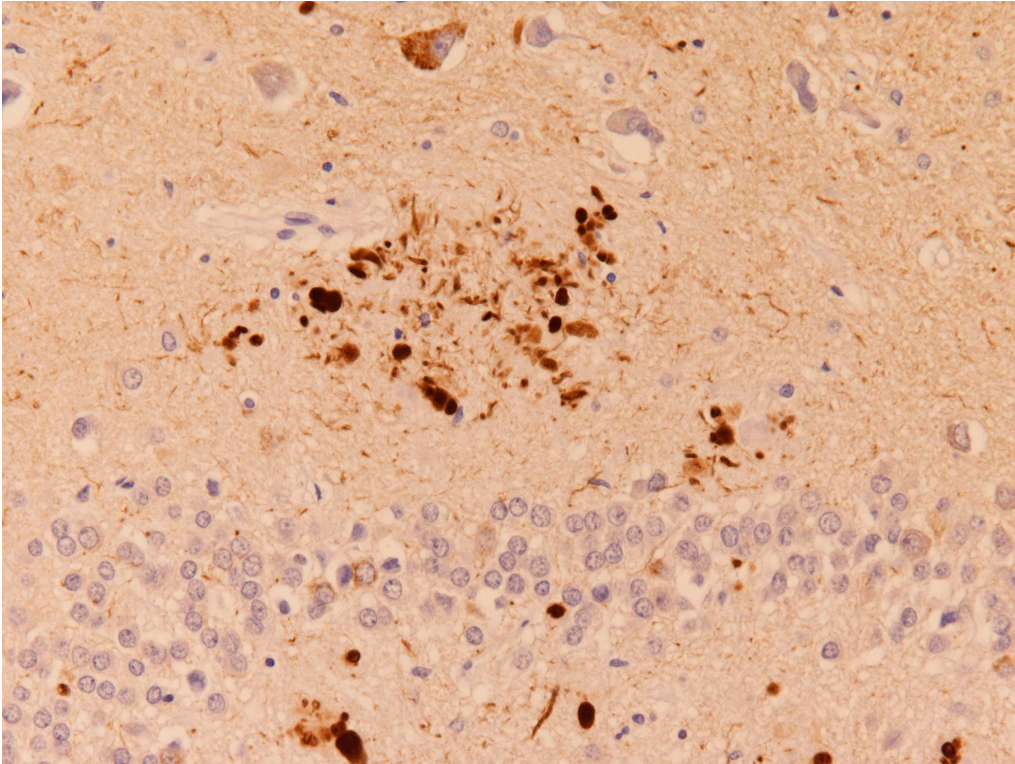


Abbildung 5.2a: DAT Tau Protein AK

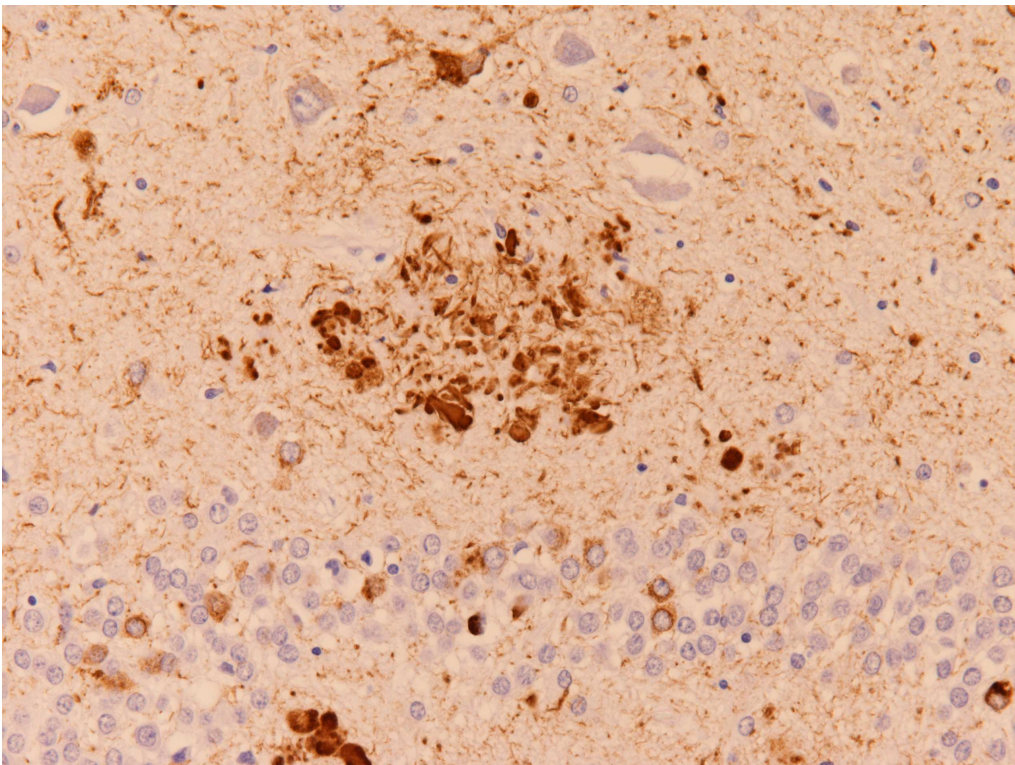


Abbildung 5.2b: DAT AT-8 AK

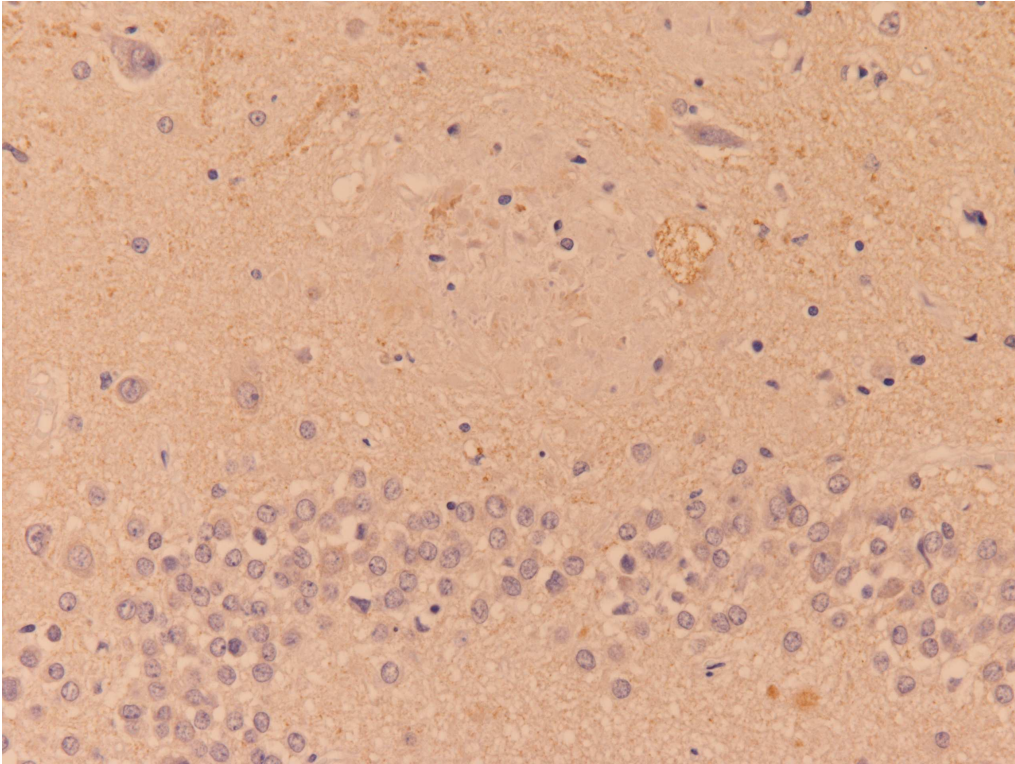


Abbildung 5.5c: DAT  $\alpha$ -Synuklein AK

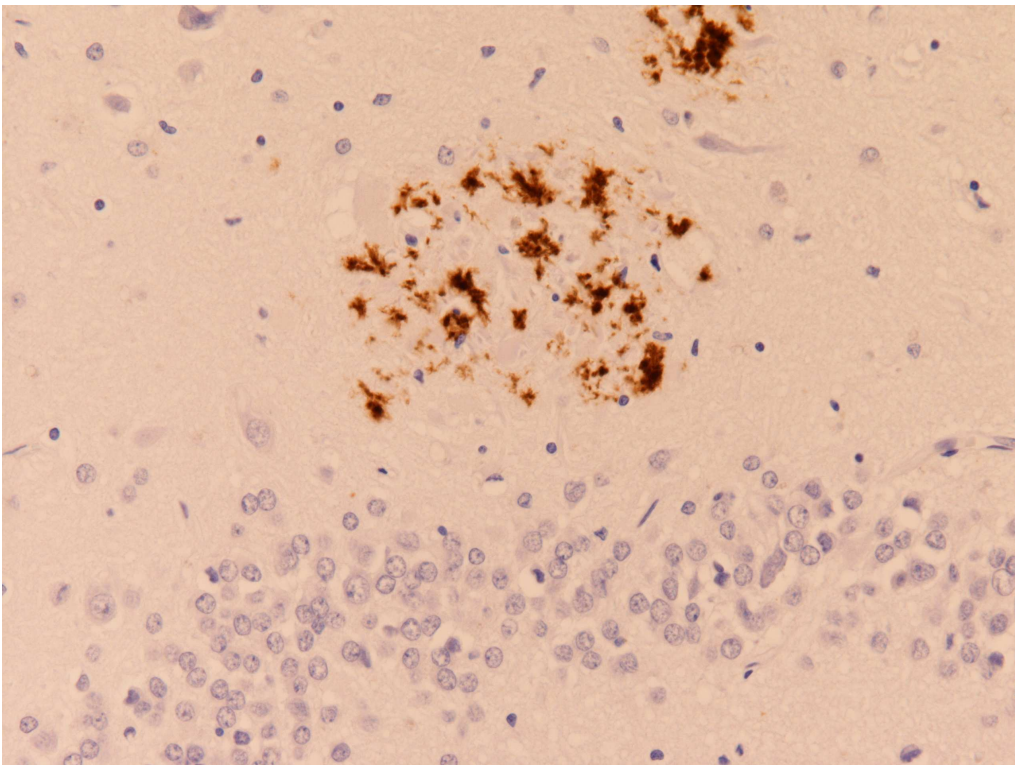


Abbildung 5.2d: DAT  $\beta$ -Protein AK

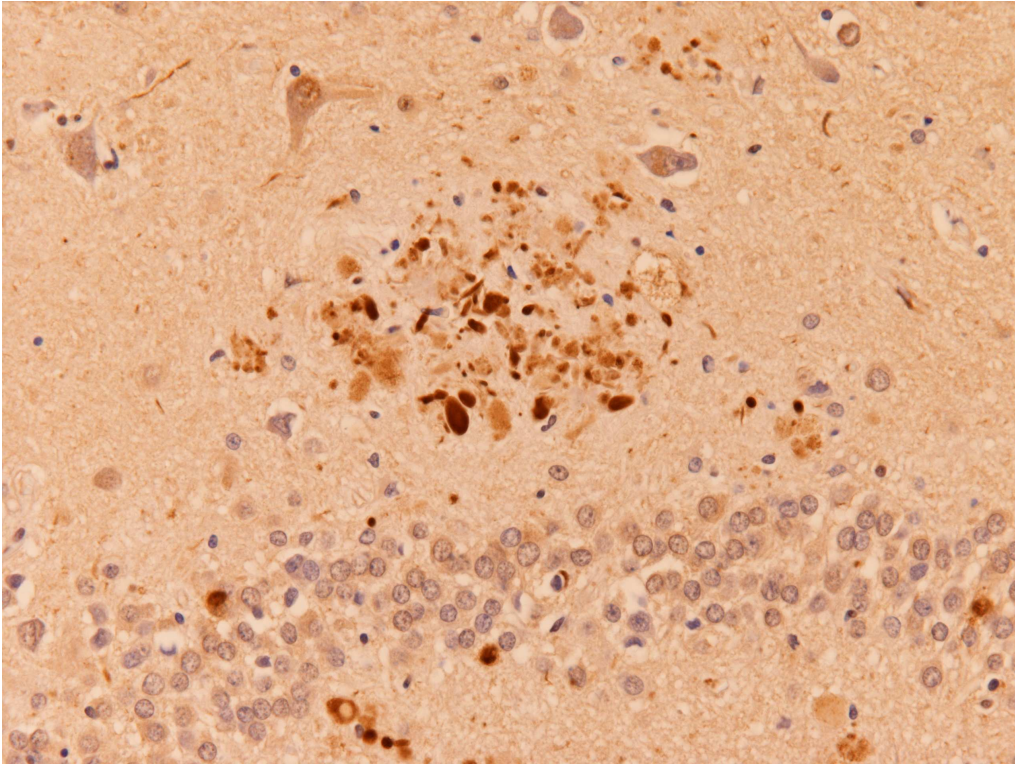


Abbildung 5.2e: DAT Ubiquitin AK

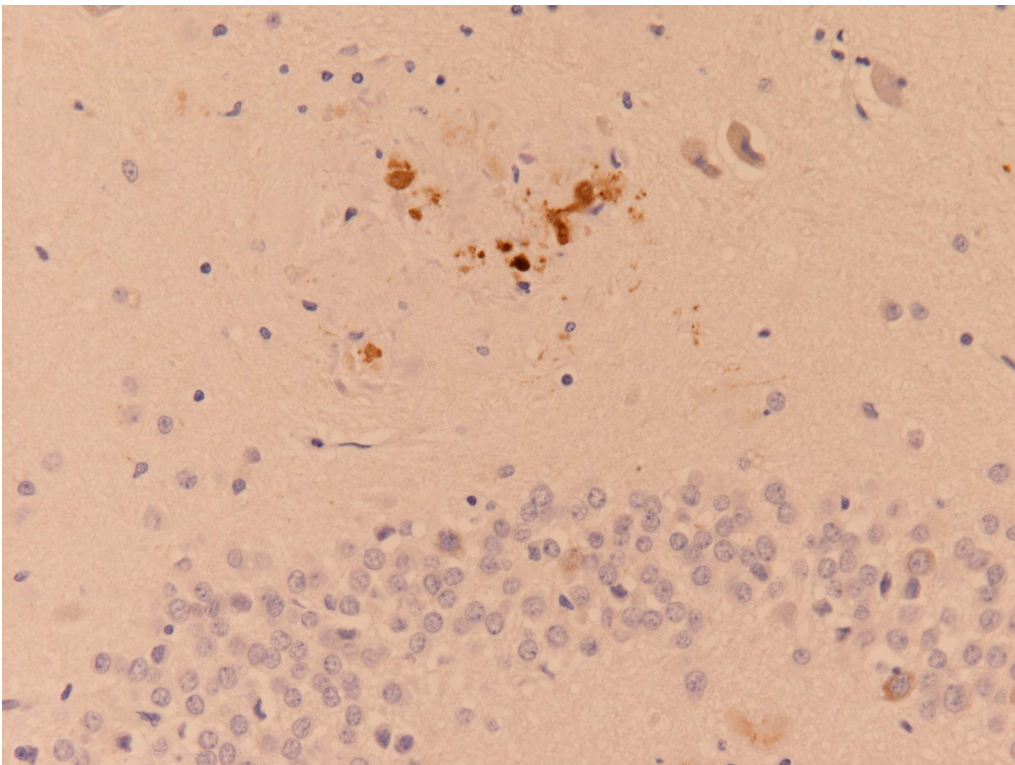


Abbildung 5.2f DAT ChromograninA AK

Abb.5.2a-5.2f: Darstellung eines AT8 +, Tau+,  $\alpha$ -Syn-,  $\beta$ -Protein+, Ubiquitin+, ChromograninA+ Plaques aus dem DAT Kollektiv

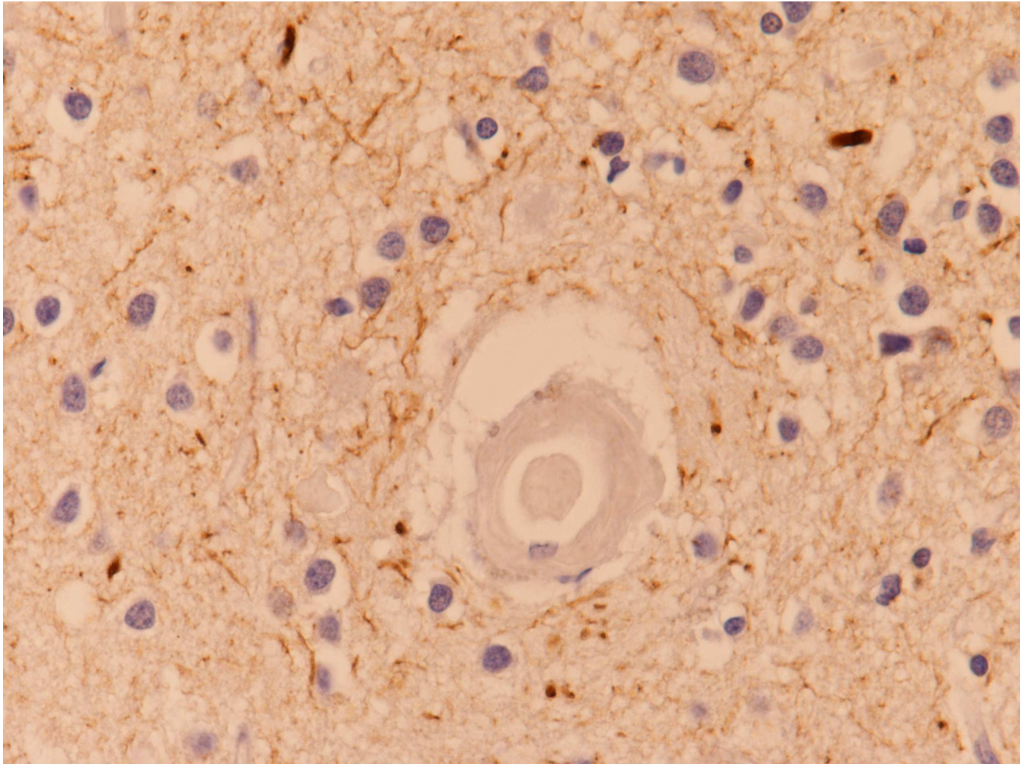


Abbildung 5.3a: DAT Tau Protein AK

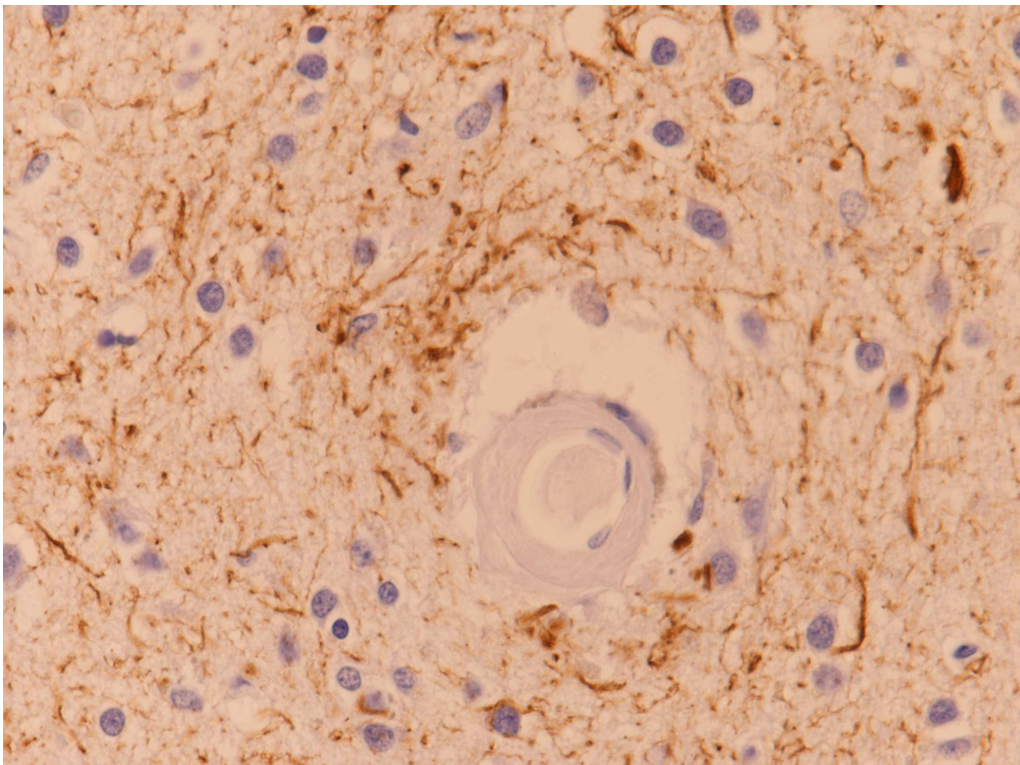


Abbildung 5.3b: DAT-8 AK

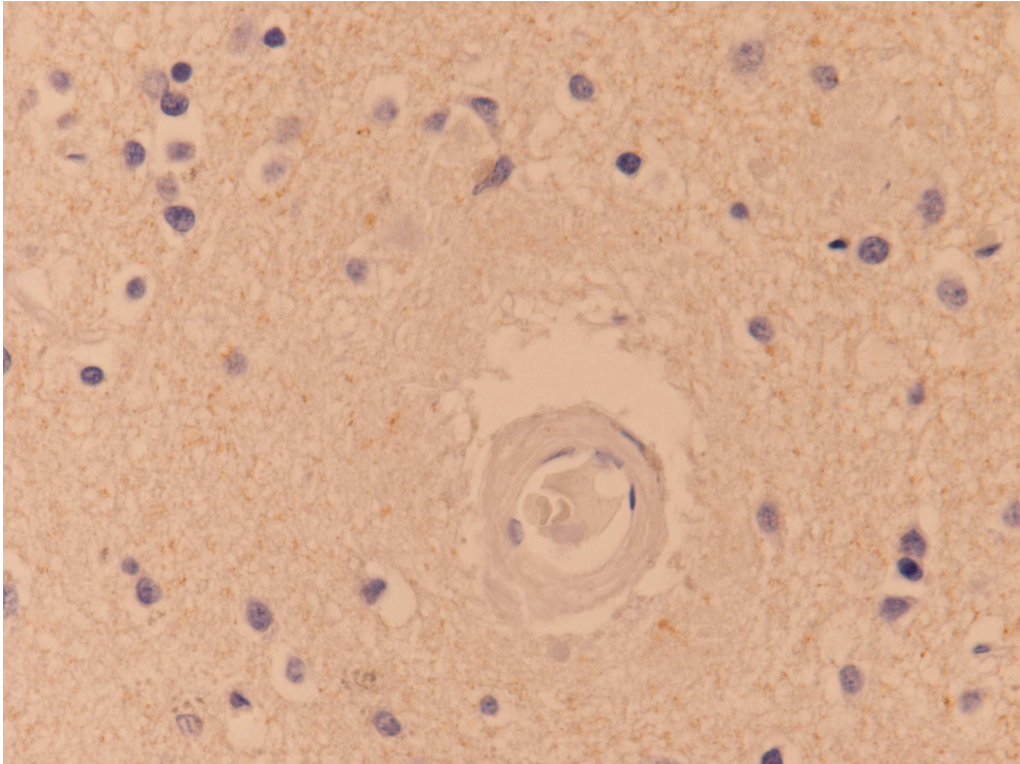


Abbildung 5.3c: DAT  $\alpha$ -Syn AK

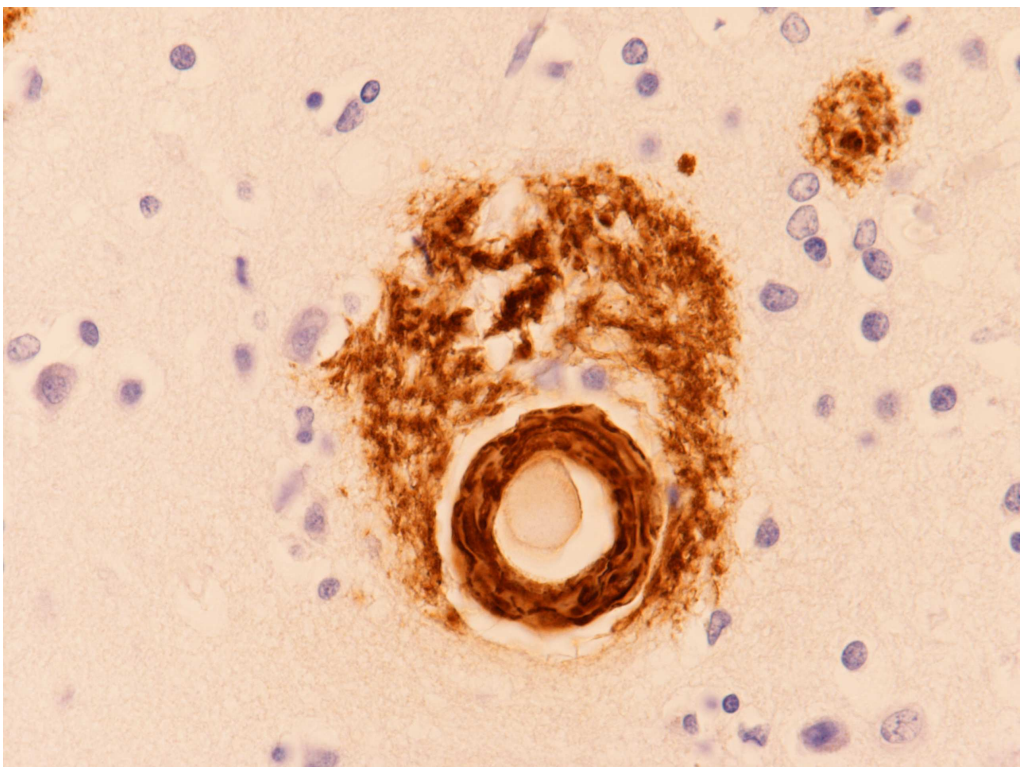


Abbildung 5.3d: DAT AT  $\beta$ -Protein AK

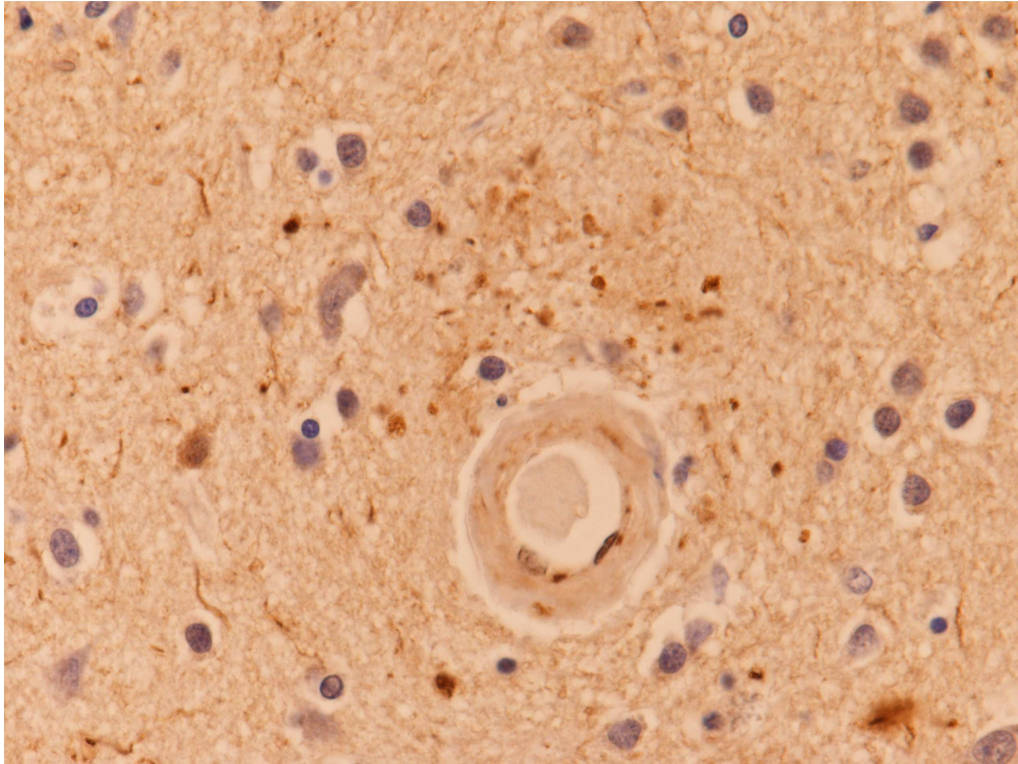


Abbildung 5.3e: DAT Ubiquitin AK

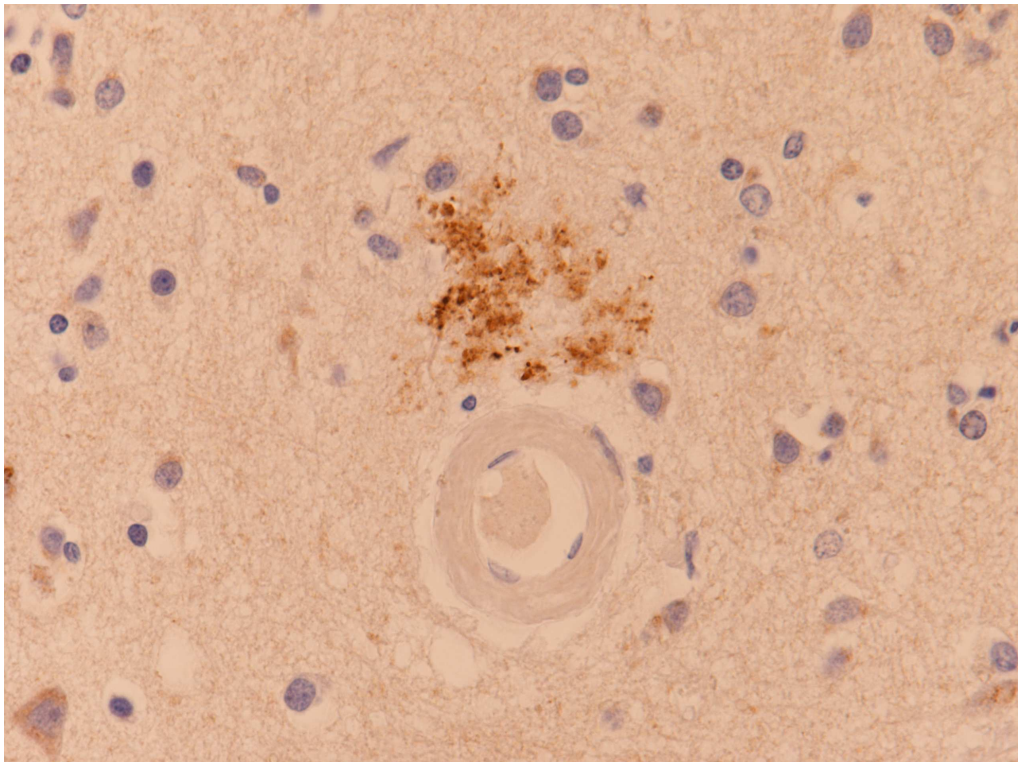


Abbildung 5.3f: DAT ChromograninA AK

Abb.5.3a-5.3f: Darstellung eines AT8 +, Tau+,  $\alpha$ -Syn-,  $\beta$ -Protein+, Ubiquitin+, ChromograninA+ Plaques aus dem DAT Kollektiv.

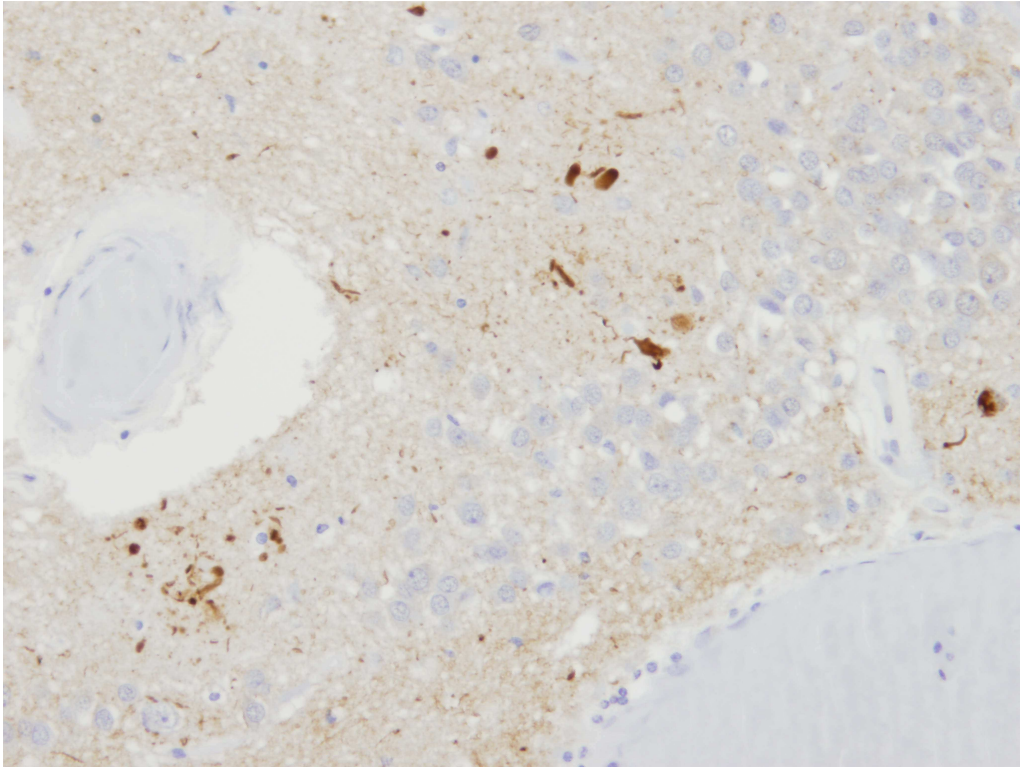


Abbildung 5.4a: DAT Tau Protein AK

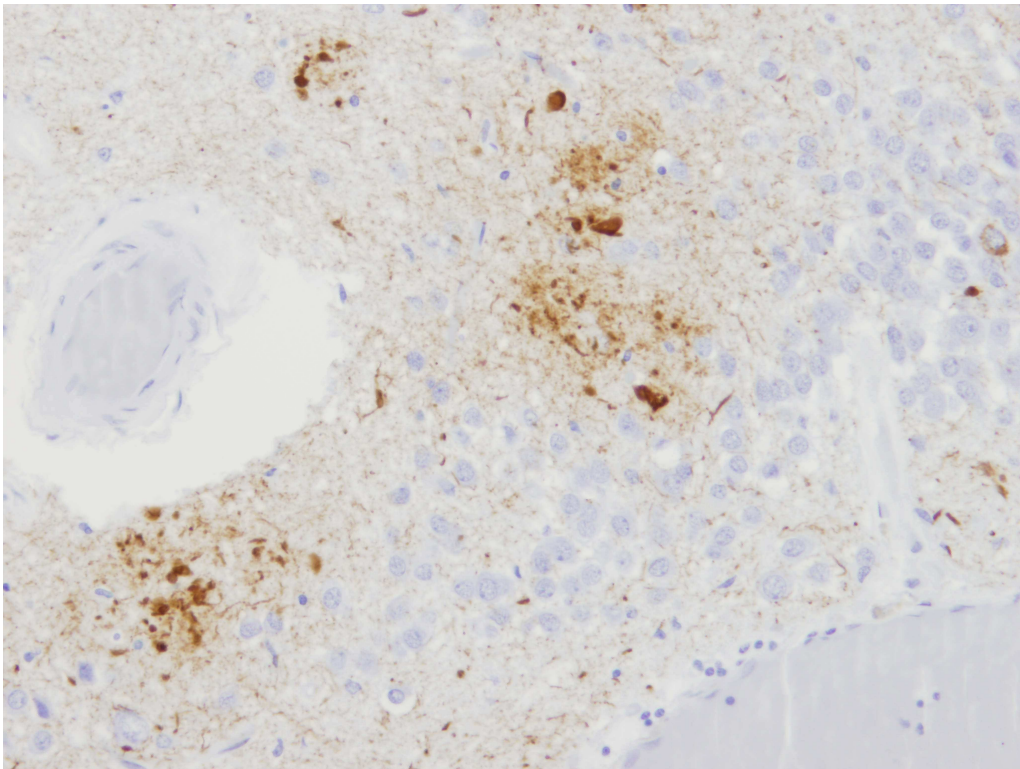


Abbildung 5.4b: DAT AT-8 AK

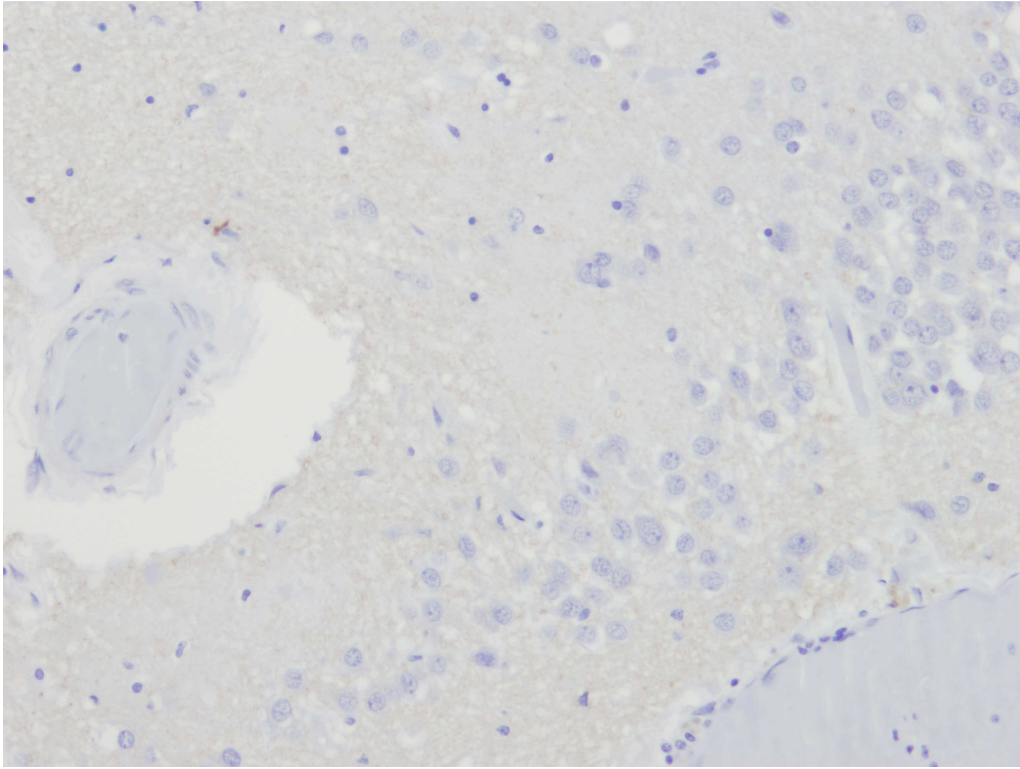


Abbildung 5.4c: DAT  $\alpha$ -Synuklein AK

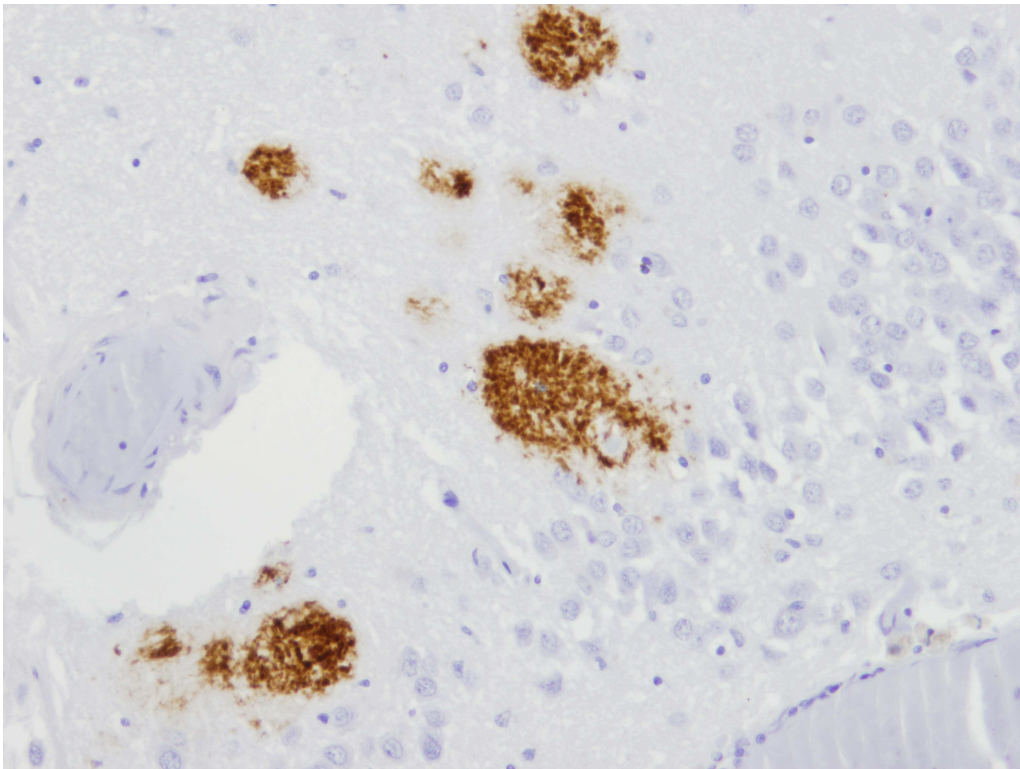


Abbildung 5.4d DAT  $\beta$ -Protein AK

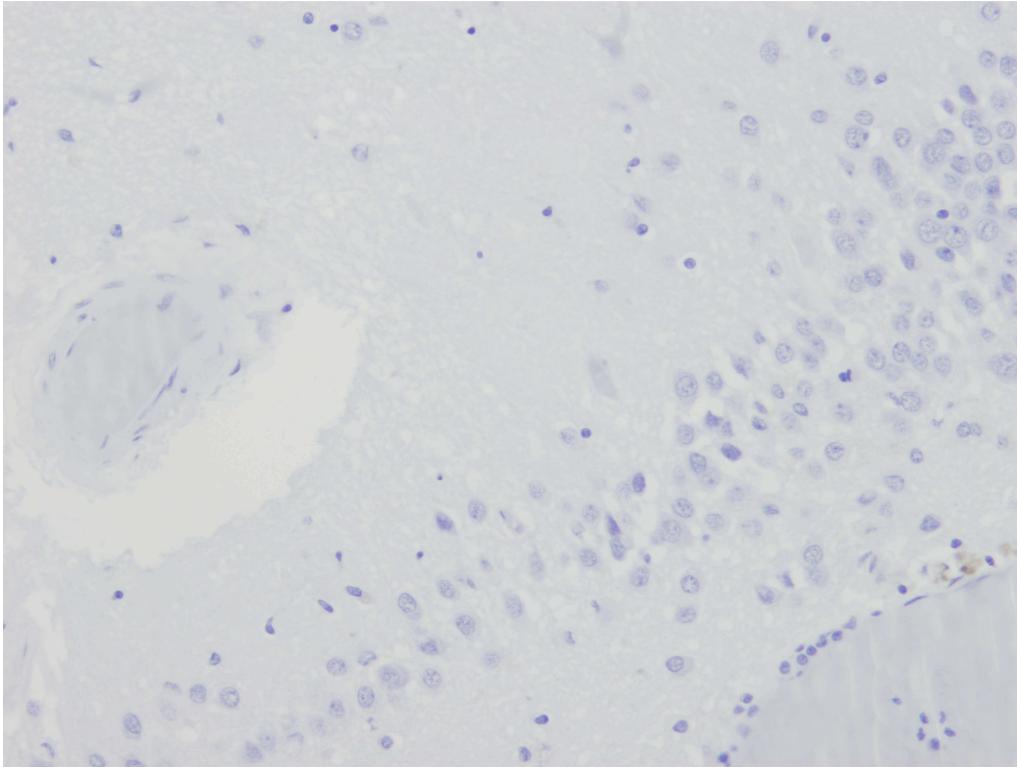


Abbildung 5.4e: DAT Ubiquitin AK

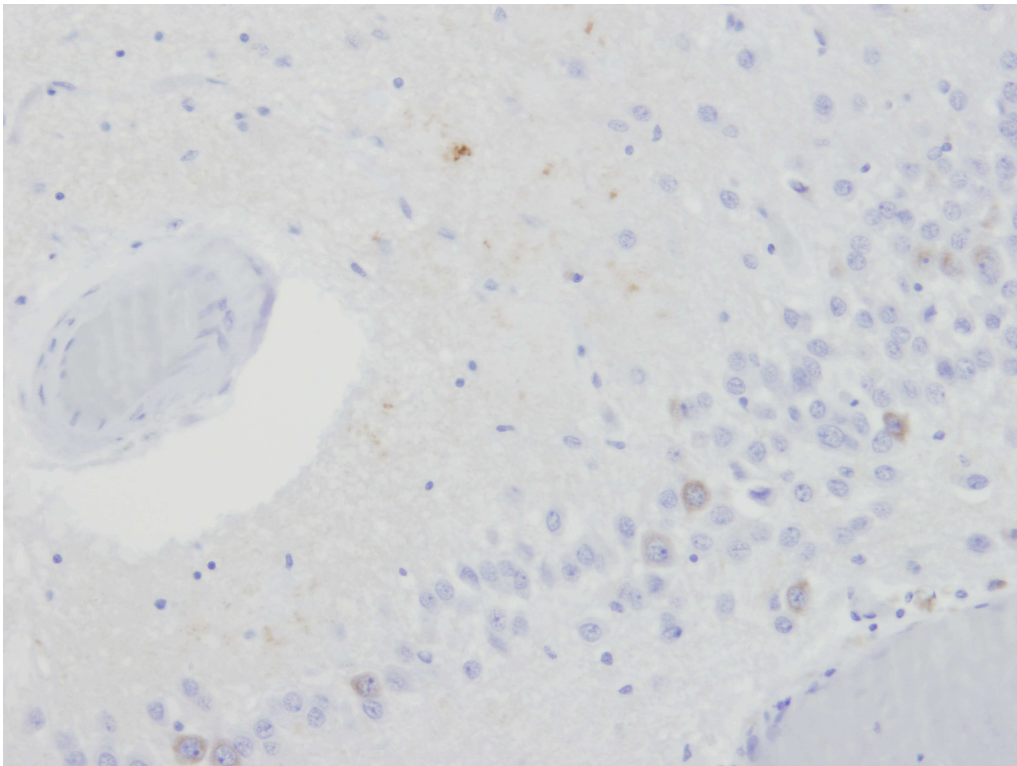


Abbildung 5.4f DAT ChromograninA AK

Abb.5.4a-5.4f: Darstellung eines AT8 +, Tau+,  $\alpha$ -Syn-,  $\beta$ -Protein+, Ubiquitin-, ChromograninA- Plaques aus dem DAT Kollektiv.

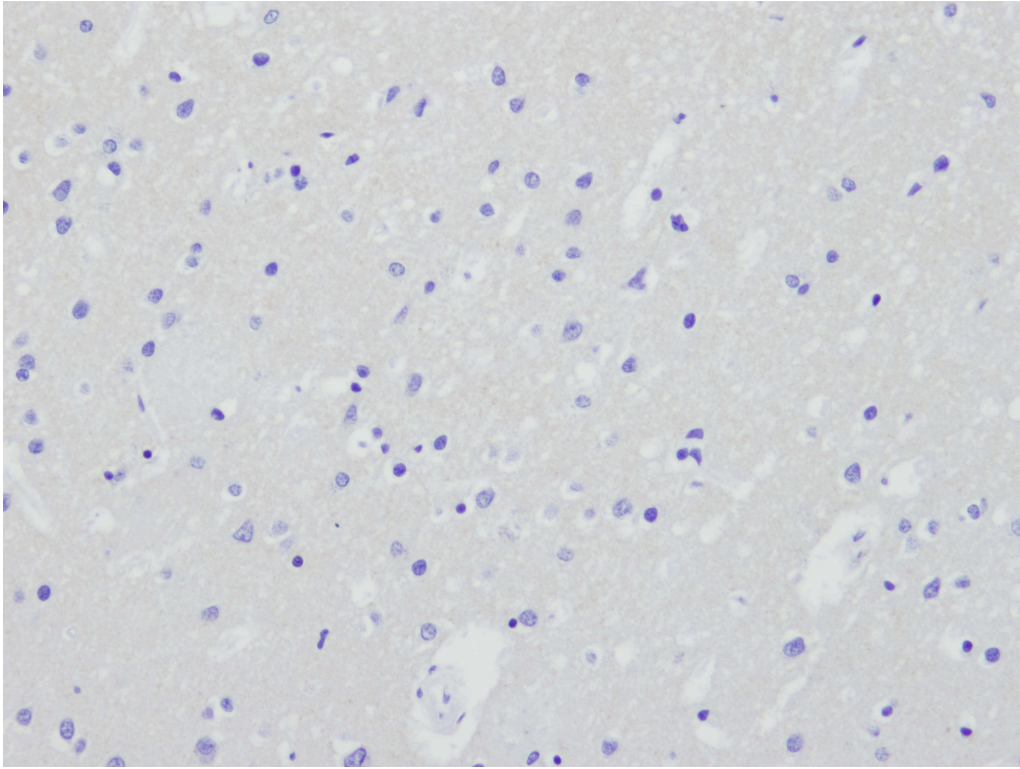


Abbildung 5.5a: DLB Tau-Protein AK

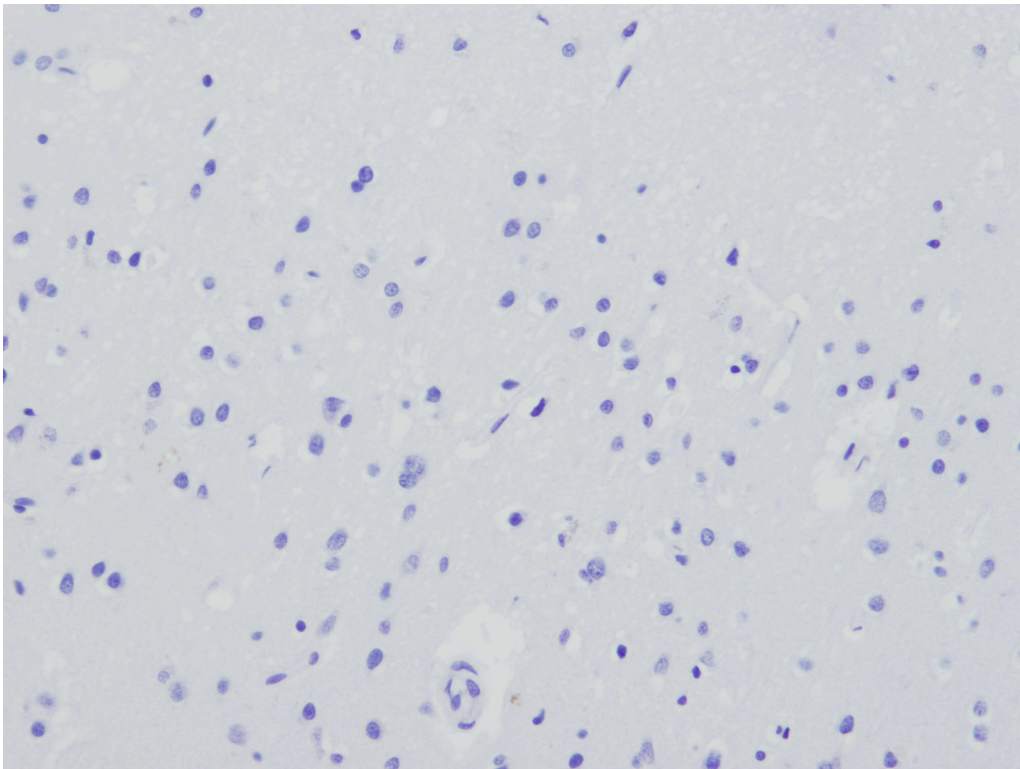


Abbildung 5.5b: DLB AT-8 AK

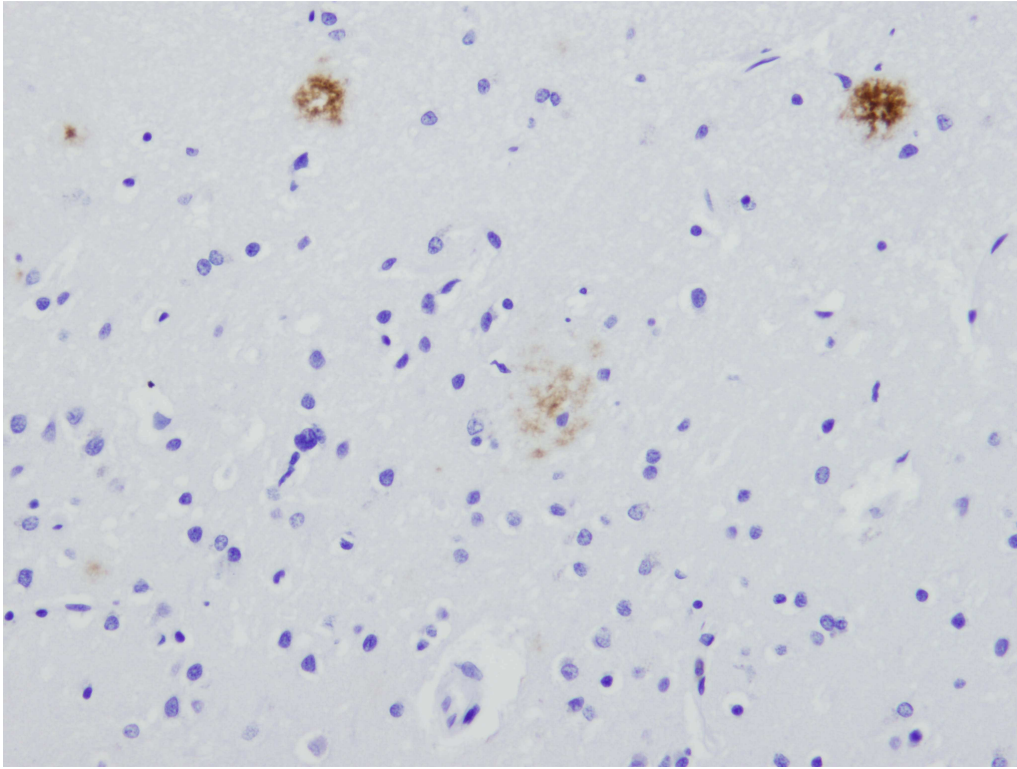


Abbildung 5.5c: DLB  $\beta$ -Protein AK

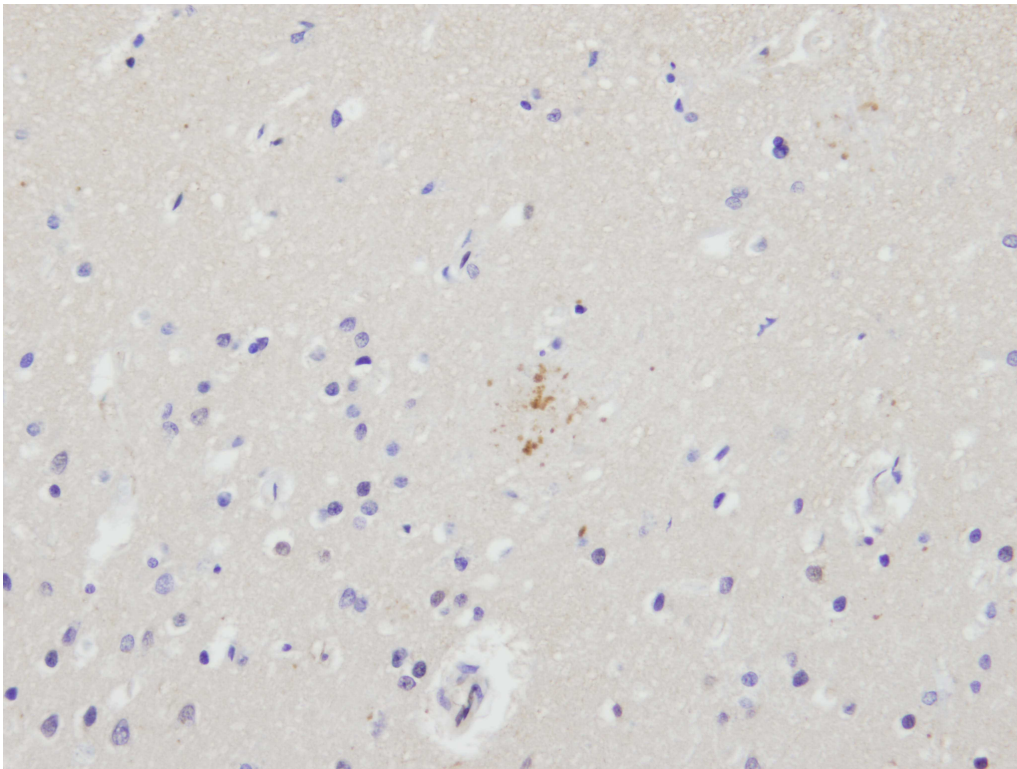


Abbildung 5.5d: DLB Ubiquitin AK

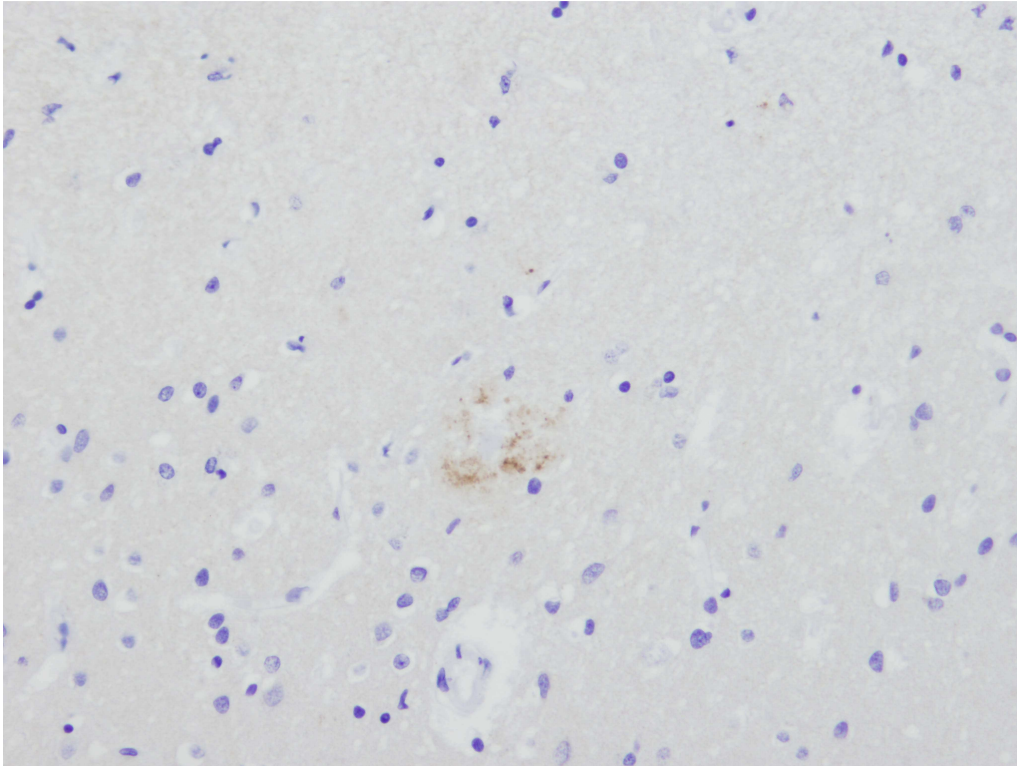


Abbildung 5.5e DLB ChgromograninA AK

Abb.5.5a-5.5e: Darstellung eines AT8 -, Tau-,  $\beta$ -Protein+, Ubiquitin+, ChromograninA+ Plaques aus dem DLB Kollektiv.

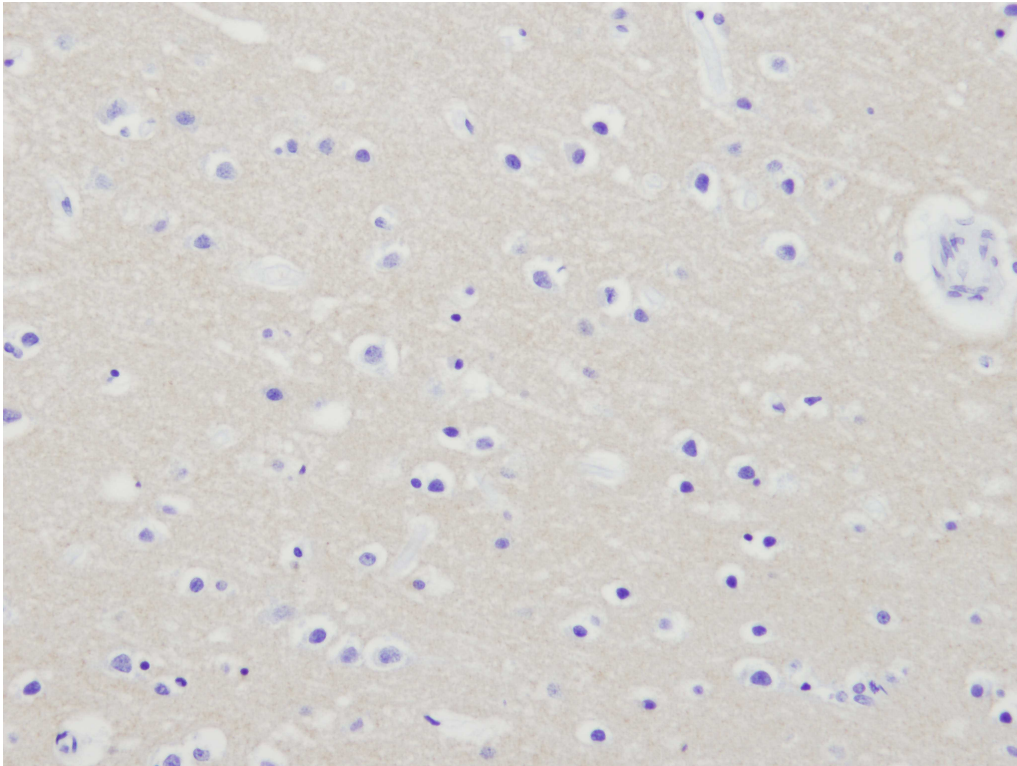


Abbildung 5.6a: NDEP Tau Protein AK

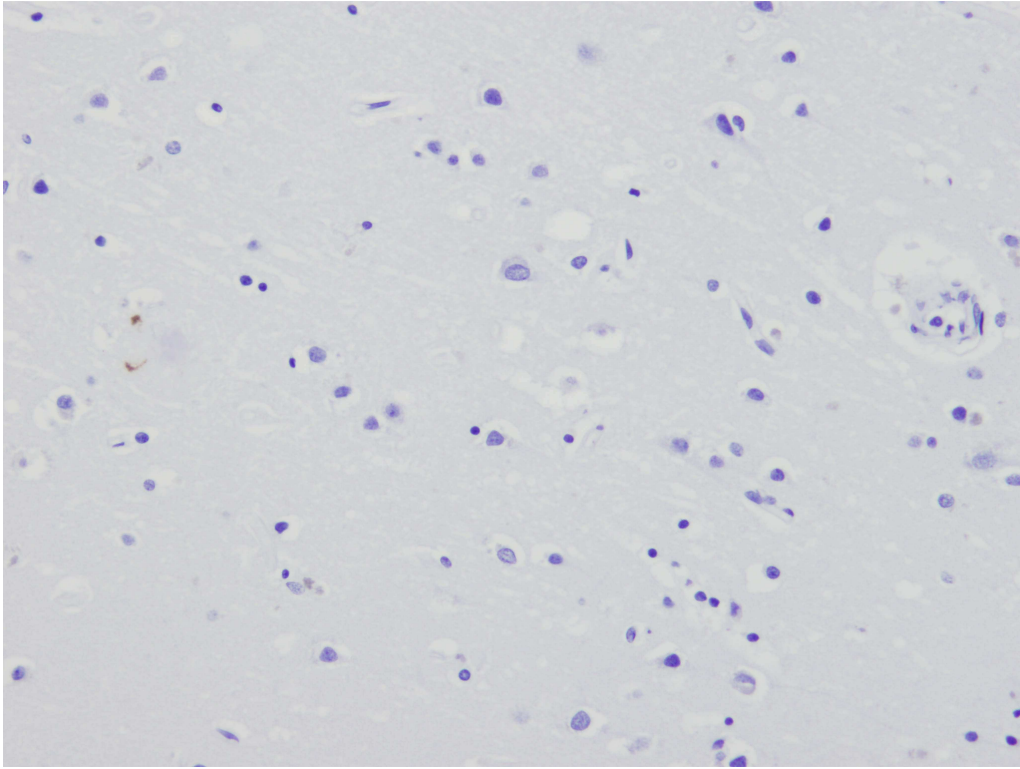


Abbildung 5.6b: NDEP AT-8 AK

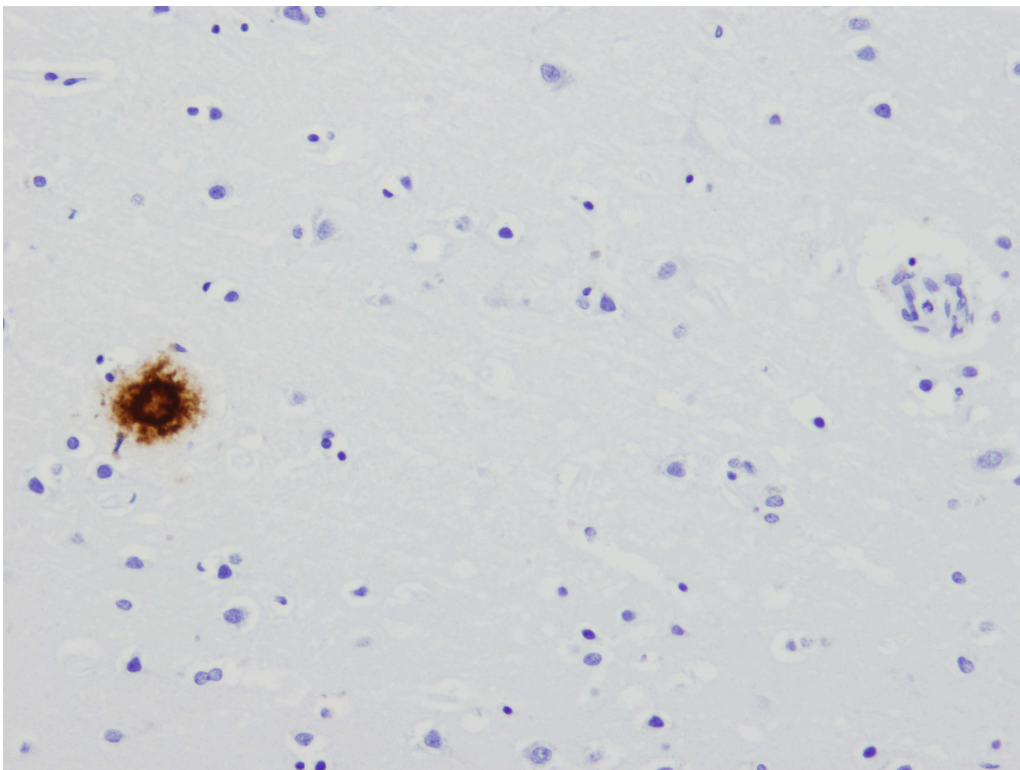


Abbildung 5.6c: NDEP  $\beta$ -Protein AK

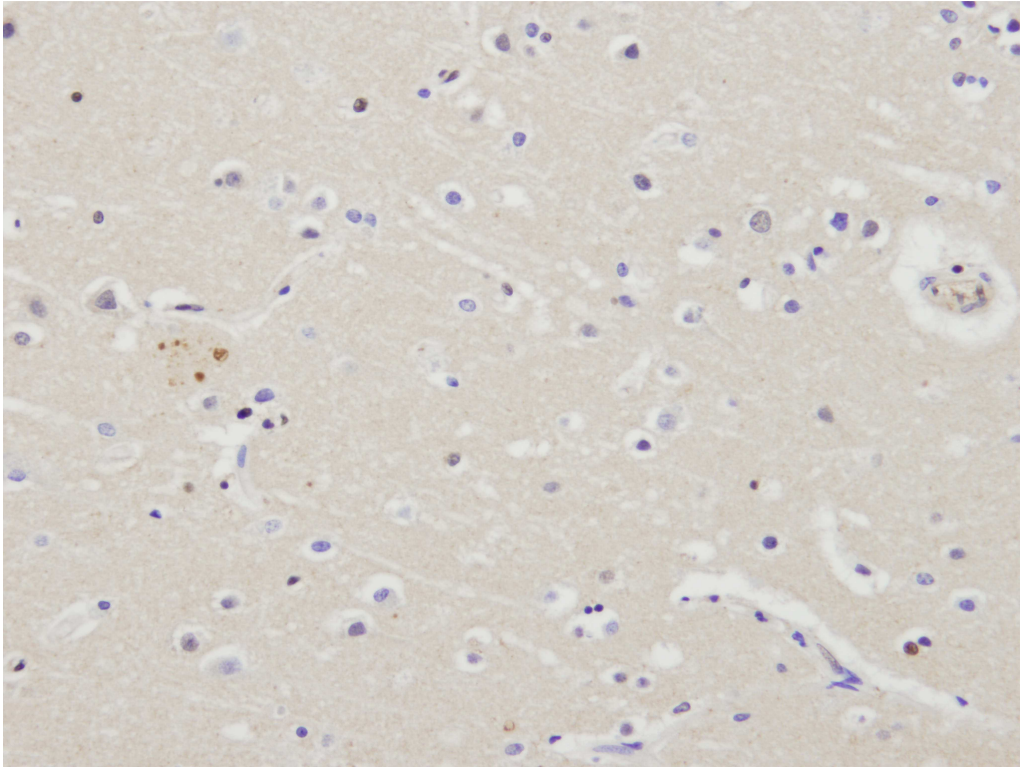


Abbildung 5.6d: NDEP Ubiquitin AK

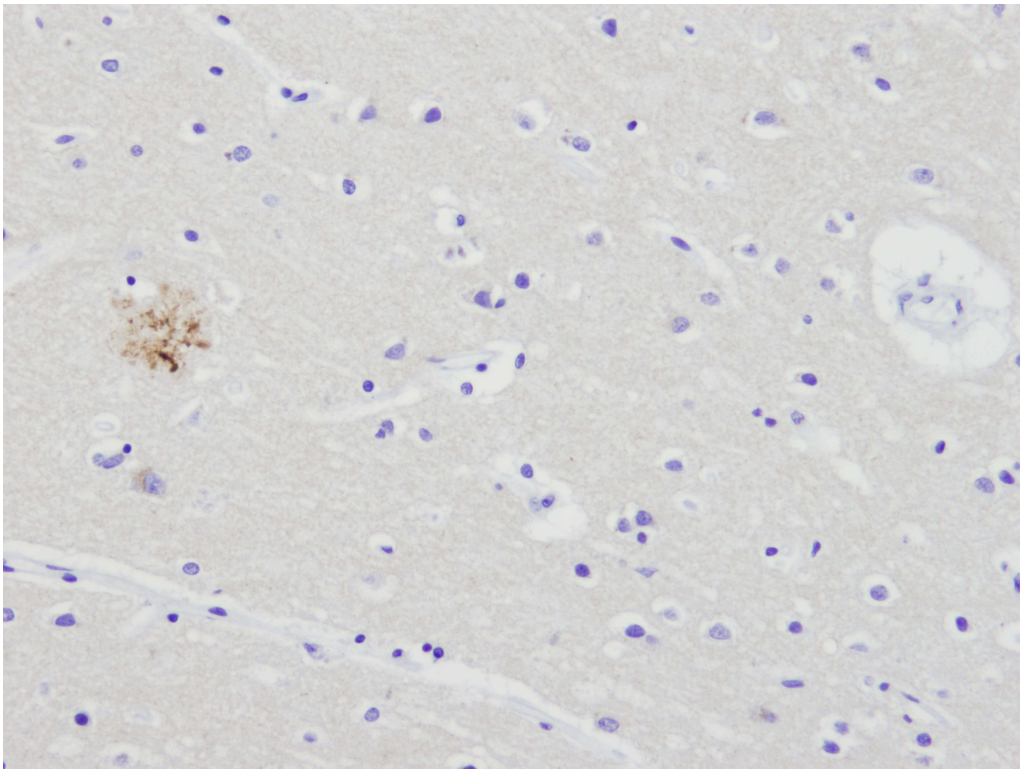


Abbildung 5.6e: NDEP ChromograninA

Abb.5.6a-5.6e: Darstellung eines AT8-, Tau-,  $\beta$ -Protein+, Ubiquitin+, ChromograninA+ Plaques aus dem NDEP Kollektiv.

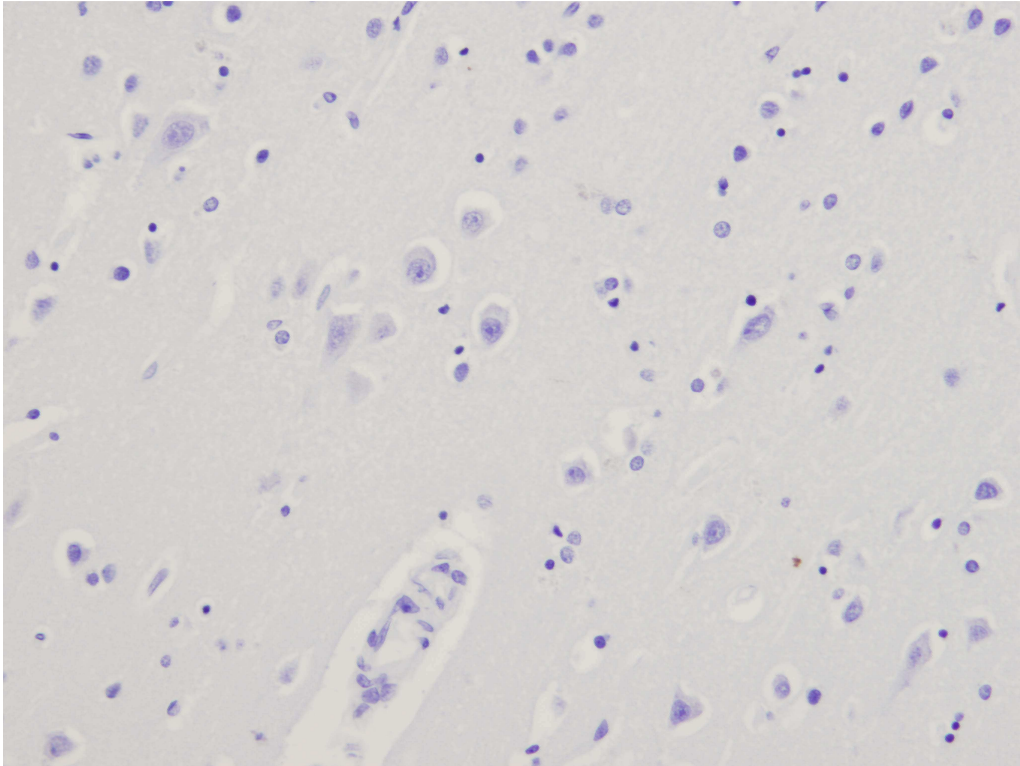


Abbildung 5.7a: NDEP Tau-Protein AK

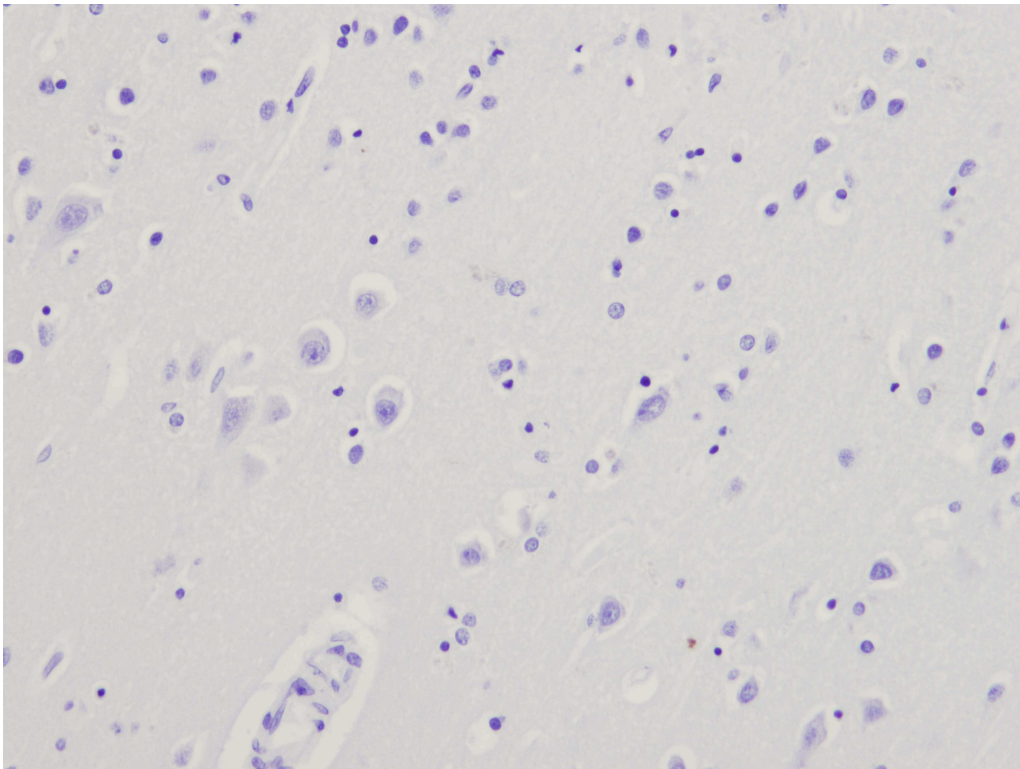


Abbildung 5.7b: NDEP AT-8 AK

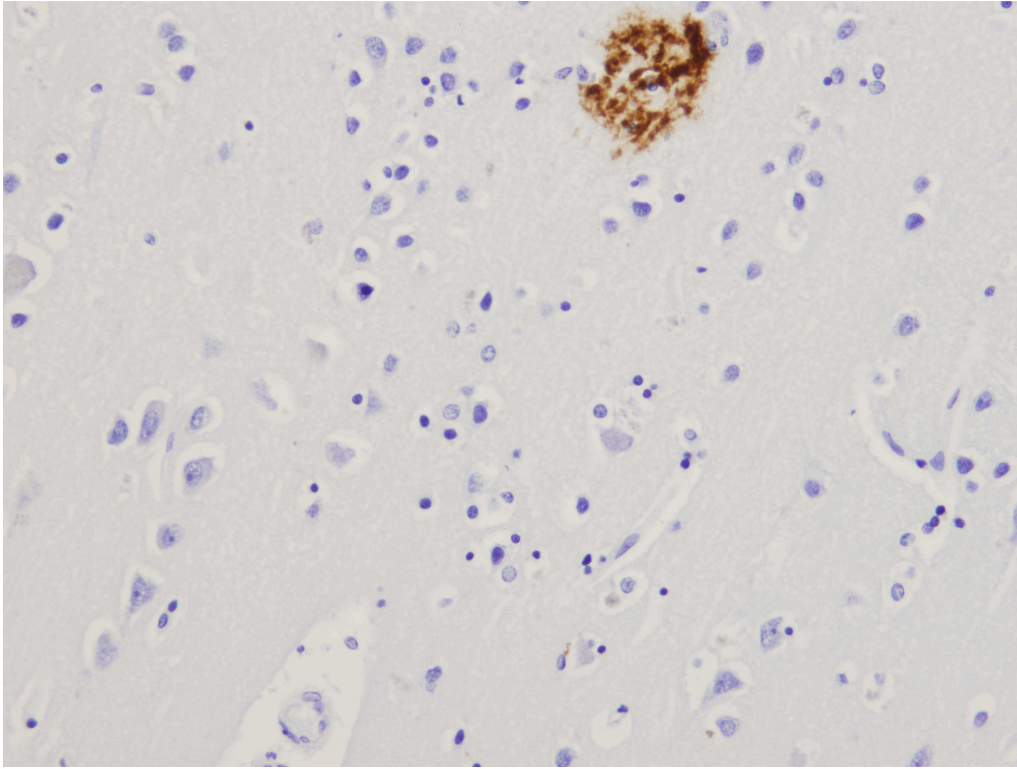


Abbildung 5.7c: NDEP  $\beta$ -Amyloid AK

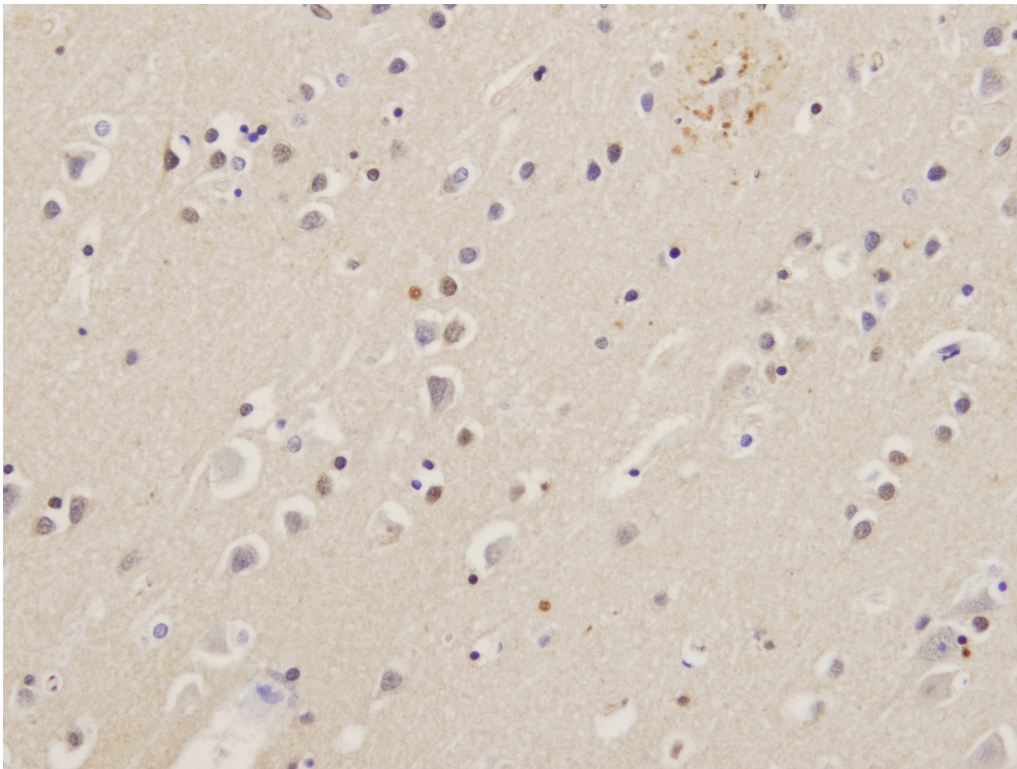


Abbildung 5.7d: NDEP Ubiquitin AK

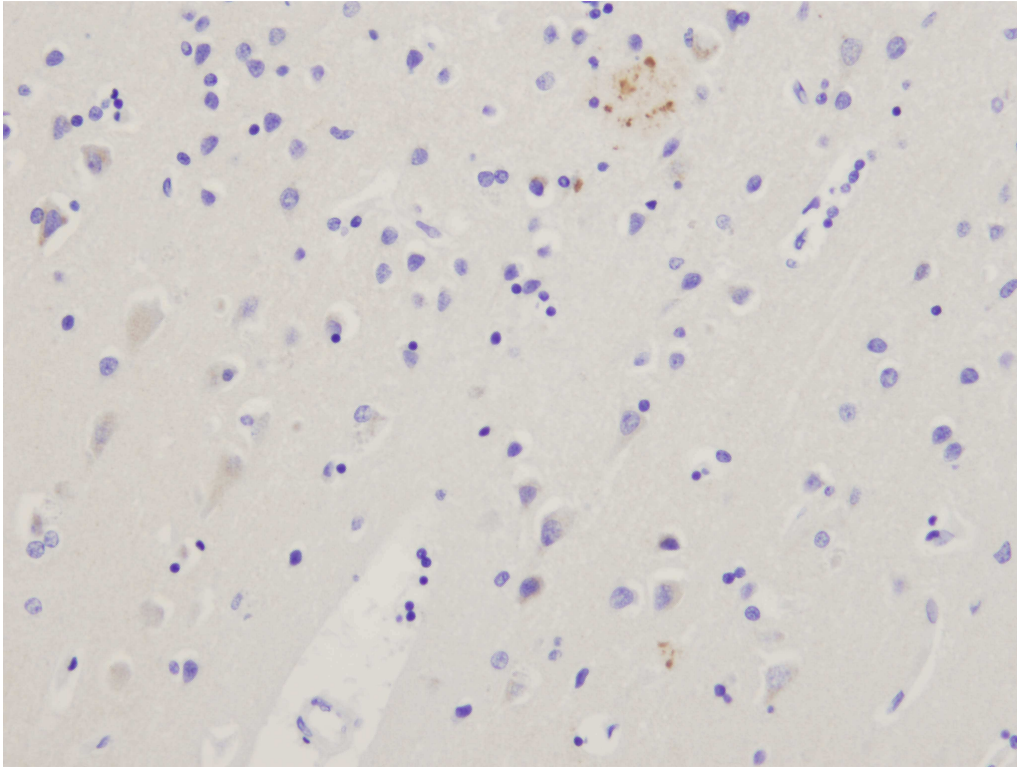


Abbildung 5.7e: NDEP ChromograninA AK

Abb.5.6a-5.6e: Darstellung eines AT8-, Tau-,  $\beta$ -Protein+, Ubiquitin+, ChromograninA+ Plaques aus dem NDEP Kollektiv.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	(Strept-) Avidin-Biotin-Complex-Methode
AD	Alzheimer's Disease
AK	Antikörper
CA	Cornu Ammonis
CAA	Cerebrale Amyloid-Angiopathie
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease'
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CSP $\alpha$	Cystein-String Alpha-Protein
DAB	3,3'- Diaminobenzidin
DAT	Demenz vom Alzheimer-Typ
DGNN	Deutsche Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie
DLB	Dementia with Lewy bodies
GCI	Glial Cytoplasmatic Inclusions
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOPS	Hirnorganisches Psychosyndrom
KG	Kontrollgruppe
NAC	Non-Amyloid Component
NACP	Non-Amyloid Component Precursor
NCI	Neuronal Cytoplasmatic Inclusions
NDEP	Non-Dement Elderly Person
NIA	National Institute of Ageing
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Parkinson's Disease
PHF	Paired helical filaments

## 7 Literaturverzeichnis

- Alzheimer A. [1907]: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin; 64: 146-148
- Abeliovich A., Schmitz Y., Fariñas I., Choi-Lundberg D., Ho W.H., Castillo P.E., Shinsky N., Verdugo J.M., Armanini M., Ryan A., Hynes M., Phillips H., Sulzer D., Rosenthal A. [2000]: Mice lacking  $\alpha$ -Synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. Neuron; 25: 239-252
- Anderton B.H. [2002]: Ageing of the brain. Mechanisms of Ageing and Development; 123: 811-817
- Anderton B.H. [1997]: Changes in the ageing brain in health and disease. Phil.Trans. R. Soc. Lond.; B 352: 1781-1792
- Arima K., Uéda K., Sunohara N., Arakawa K., Hirai S., Nakamura M., Tonzuka-Uehara H., Kawai M. [1998]: NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei of multiple system atrophy. Acta Neuropathol. (Berl.); 96: 439-444
- Armstrong R.A. [1995]: Is the clustering of beta-Amyloid (A-beta) deposits in the frontal cortex of Alzheimer patients determined by blood vessels? Neurosci. Lett.; 195: 121-124
- Baba M., Nakajo S., Tu P.H., Tomita T., Nakaya K., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Iwatsubo T. [1998]: Aggregation of a-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Am J Pathol.; 152: 879-884
- Beyer K. [2006] Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. Acta Neuropathol. (Berl. ); 112: 237-251
- Beyer K., Lao J.I., Carrato C., Mate J.L., López D., Ferrer I., Ariza A. [2004]: Differential expression of  $\alpha$ -Synuclein isoforms in dementia with Lewy Bodies. Neuropathology and Applied Neurobiology; 30: 601-607
- Boenisch T., Farmilo A.J., Stead R.H. [2003]: Färbemethoden-Detektionssysteme. In: Boenisch T., Farmilo A.J., Stead R.H., Immunchemische Färbemethoden 3.Aufl., DAKOCytomation, Carpinteria USA, 34-42
- Bonini N.M., Giasson B.I. [2005]: Snaring the function of alpha-synuclein. Cell; 123: 359-361
- 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; Mar/Apr, 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., Braak E., Yilmazer D., de Vos R.A., Jansen E.N., Bohl J., Jellinger K. [1994]: Amygdala pathology in Parkinson's disease. Acta Neuropathol; 88: 493-500
- 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 H., Sandmann-Keil D., Gai W., Braak E. [1999]: Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry. *Neurosci. Lett*; 265: 67-69
- Buchman V.L., Adu J., Pinon L.G.P., Ninkina N.N., Davies A.M. [1998]: Persyn, a member of the synuclein family, influences neurofilament network integrity. *Nature Neurosci*;1: 101-103
- Castagnet P.I., Golovko M.Y., Barcelo-Coblijn G.C., Nussbaum R.L., Murphy E.J. [2005]: Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from  $\alpha$ -synuclein gene ablated mice. *J. Neurochem.*; 94: 839-849
- Chandra S., Gallardo G., Fernandez-Chacon R., Schlüter O.M., Südhof T.C. [2005]: Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell*; 123: 383-396
- Charles V., Mezey E., Reddy P.H., Dehejia A., Young T.A., Polymeropoulos M.H., Brownstein M.J., Tagle D.A. [2000]: Alpha-synuclein immunoreactivity of huntingtin polyglutamine aggregates in striatum and cortex of Huntington's disease patients and transgenic mouse models. *Neurosci. Lett.*; 289: 29-32
- Clayton D.F., George J.M. [1999]: Synuclein in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.*; 58: 120-129
- Culvenor J.G., McLean C.A., Cutt S., Campbell B.C., Maher F., Jäkälä P., Hartmann T., Beyreuther K., Masters C.L., Li Q.X. [1999]: Non-A $\beta$  Component of Alzheimer's Disease Amyloid (NAC) Revisited: NAC and  $\alpha$ -Synuclein Are Not Associated with A $\beta$ -Amyloid. *American Journal of Pathology*; Vol. 155 (No 4): 1173-1181
- DAKO GmbH [2008]: [www.dakogmbh.de](http://www.dakogmbh.de), 21.03.2008, 13.00 h
- DAKO GmbH [2008]:[www.dakogmbh.de](http://www.dakogmbh.de), 27.03.2008, 18.30 h
- Deramecourt V., Bombois S., Maurage C.A., Ghestem A., Drobecq H., Vanmechelen E., Lebert F., Pasquier F., Delacourte A. [2006]: Biochemical Staging of Synucleinopathy and Amyloid Deposition in Dementia With Lewy Bodies, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 65: 278-288
- Dimakopoulos A.C. [2005]: Protein aggregation in Alzheimer's disease and other neuropathological disorders. *Curr Alzheimer Res.*; 2 (1): 19-28
- Dickson D.W. [1997]: The pathogenesis of senile Plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 56: 321-339
- Dickson D.W., Ruan D., Crystal H., Mark M.H., Davies P., Kress Y., Yen S.H. [1991]: Hippocampal degeneration differentiates diffuse Lewy body disease from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunohistochemistry of CA 2-3 neurites specific to diffuse Lewy body disease. *Neurology*; 41: 1402-1409
- Duyckaerts Charles; Delatour Benoît; Potier Marie-Claude[2009]: Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica* 118(1):5-36
- Elfenbein H.A., Rosen R.F., Stephens S.L., Switzer R.C., Smith Y., Pare J., Mehta P.D., Warzok R., Walker L.C. [2007]: Cerebral amyloid angiopathy in aged squirrel monkeys. *Histol. Histopathol.*; 22: 155-167
- Ellison D., Love S., Chimelli L., Harding B.N., Lowe J., Vinters H.V. [2004]: Alzheimer's disease. In: Ellison D., Love S., Chimelli L., Harding B.N., Lowe J., Vinters H.V., *Neuropathology - A reference text of CNS pathology*. Mosby Elsevier; 550-565
- Eschbach D.-A, Jünemann M.B.T, Da Silva K, 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 Neuropathologica* Vol 116 N.3 S. 342
- 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

- Farkas E., Luiten P.G. [2001]: Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.*; 64: 575–611.
- Forno L.S., [1996]: Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 55: 259-272
- Furlong R.A., Narain Y., Ranking J., Wytenbach A., Rubinsztein D.C. [2000]: alpha-synuclein overexpression promotes aggregation of mutant huntingtin. *Biochem. J.*; 346 (Pt 3): 577-581
- Gai W.P., Power J.H.T., Blumbergs P.C., Blessing W.W. [1998]: Multiple-system atrophy: a new alpha-synuclein disease? *Lancet*; 352: 547–548.
- Giasson B.I., Forman M.S., Higuchi M., Golbe L.I., Graves C.L., Kotzbauer P.T., Trojanowski J.Q., Lee V.M. [2003]: Initiation and synergistic fibrillization of Tau and alpha-synuclein. *Science*; 300: 636–640
- Galvin J.E., Lee V.M., Trojanowski J.Q. [2001]: Synucleinopathies clinical and pathological implications. *Arch. Neurol.*; Feb 58(2): 186-19
- Galpern W.R, Lang AE.[2006]: Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Ann Neurol.*; 59: 449–58.30. Goedert M., Spillantini M.G., Serpell I.C., Berriman J., Smith M. J., Jakes R., Crowther R.A. [2001]: Tau and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*; 356: 213-227
- Geddes J. W. [2005]: alpha-Synuclein: a potent inducer of tau pathology. *Exp Neurol.* 192: 244– 50.
- Goedert M., Spillantini M. G., Serpell Goedert M, Spillantini MG, Serpell LC, Berriman J, Smith MJ, Jakes R, Crowther RA. [2001]: Tau and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*;Feb. 28 356: 213-227
- Golovko M.Y., Feargeman N.J., Cole M.B. [2005]: Alpha-synuclein gene deletion decreases brain palmitate uptake and alters the palmitate metabolism in the absence of alpha-synuclein palmitate binding. *Biochemistry*; 44: 8251-8259
- 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
- Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y., Vigo-Pelfrey C., Mellon A., Ostaszewski B.L., Lieberburg I., Koo E.H., Schenk D., Teplow D.B. [1992]: Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*; 359: 322-25
- Han H., Weinreb P.H., Lansbury P.T. Jr. [1995]: The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem. Biol.*; 2: 163-169
- Hansen L.A., Samuel W. [1997]: Criteria for Alzheimer's disease and the nosology of dementia with Lewy bodies. *Neurol.*; 48: 126-132.
- Harding A.J., Halliday G.M. [2001]: Cortical Lewy body pathology in the diagnosis of dementia. *Acta Neuropathol (Berl.)*; 102: 355–63
- Hardy J, Selkoe DJ. [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
- Hyman B., Trojanowski J. [1997]: Editorial on consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute working group on diagnostic criteria for the

- neuropathological assessment of Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 56: 1095-1097.
- Irizarry M.C., Growdon W., Gomez-Isla T., Newell K., George J.M., Clayton D.F., Hyman B.T. [1998]: Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain  $\alpha$ -synuclein immunoreactivity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 57: 334–337
- Iseki E., Togo T., Suzuki K., Katsuse O., Marui W., de Silva R., Lees A., Yamamoto T., Kosaka K. [2003]: Dementia with Lewy bodies from the perspective of Tauopathy. *Acta Neuropathol*; 105: 265–270
- Ishizawa T., Mattila P., Davies P., Wang D., Dickson D.W. [2003]: Colocalization of Tau and  $\alpha$ -synuclein epitopes in Lewy bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 62: 389–397
- Iwai A., Yoshimoto M., Masliah E., Saitoh T. [1995]: Non-A-beta component of Alzheimer's disease amyloid (NAC) is amyloidogenic. *Biochemistry.*; 34: 10139–10145
- Jakes R., Spillantini M.G., Goedert M. [1994]: Identifications of two distinct synucleins from human brain. *FEBS. Lett.*; 345: 27-34
- Jellinger K.A. [2003]: Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov. Disord.*; 18 (Suppl. 6): 2-12
- Jellinger K., Attems J. [2008]: Prevalence and impact of vascular and Alzheimer pathologies in Lewy body disease. *Acta Neuropathol.*; 115: 427-436.
- Jünemann M.B.T. [2010]: Das immunhistologische Profil seniler Plaques in Gehirnen bei M. Alzheimer und nicht-dementen alten Menschen. Dissertation d. FB. Med.J.-L. Universität Giessen.
- Jünemann M.B.T, Eschbach D.-A, Da Silva K, Kuchelmeister K.[2008]: Immunohistological profile of senile plaques in Alzheimer's disease brains and brains of non-demented elderly persons. *Acta Neuropathologica Vol 116 N.3 S. 347*
- 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
- Kondo J., Honda T., Mori H., Hamada Y., Miura R., Ogawara M., Ihara Y. [1988]: The carboxyl third of Tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron.*; 1: 327-834.
- Lashley T, Holton J.L, Gray E, Kirkham K, O'Sullivan SS, Hilbig A, Wood NW, Lees AJ, Revesz T.[2008]: Cortical  $\alpha$ -synuclein load is associated with amyloid- $\beta$  plaque burden in a subset of Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol.*; 115: 417–25.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E.[ 2001]: Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*; 293: 1487–91.
- Lippa C.F., Fujiwara H., Mann D.M.A., Giasson B., Baba M., Schmidt M.L., Nee L.E., O'Connell B., Pollen D.A., George-Hyslop P., Ghetti B., Nochlin D., Bird T.D., Cairns N.J., Lee V.M., Iwatsubo T., Trojanowski J.Q. [1998]: Lewy bodies contain altered  $\alpha$ -synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and Amyloid precursor protein genes. *Am. J. Pathol.*; 153: 1365–137
- Löffler G., Petrides P.E. [2003]: *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer Verlag, S.1068f.
- McKeath I.D., Dickson D.W., Loewe J., Emre M., O'Brien J.T., Feldman H., Cummings J., Duda J.E., Lippa C., Perry E.K., Aarsland D., Arai H., Ballard C.G., Boeve B., Burn D.J., Costa D., Del Ser T., Dubois B., Galasko D., Gauthier S., Goetz C.G., Gomez-Tortosa E., Halliday G., Hansen L.A., Hardy J., Iwatsubo T.,

- Kalaria R.N., Kaufer D., Kenny R.A., Korczyn A., Kosaka K., Lee V.M., Lees A., Litvan I., Londos E., Lopez O.L., Minoshima S., Mizuno Y., Molina J.A., Mukaetova-Ladinska E.B., Pasquier F., Perry R.H., Schulz J.B., Trojanowski J.Q.; [2005]: Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. Third report of the DLB consortium. *Neurology*, 65, 1863-1872
- Mackenzie I. R. [1994]: Senile plaques do not progressively accumulate with normal aging. *Acta Neuropathol.* 87(5): 520-525
- Maries E, Dass B, Collier TJ, Kordower JH, Steece-Collier K [2003]: The role of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci*; 4: 727-38.
- Marksteiner J., K Yamada M, Kaufmann W.A., Gurka P., Humpel C. [2002]: Synaptic proteins in Alzheimer's disease *J. Neurol. Neurosci.*; 18(1-2): 53-63
- Maslah E., Iwai A., Mallory M., Ueda K., Saitoh T. [1996]: Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*; 148: 201-210
- Maslah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Mallory M, Hashimoto M, Mucke L. [2001]:  $\beta$ -Amyloid peptides enhance  $\alpha$ -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 12245-50.
- Mezey E., Dehejia A., Harta G., Papp M.I., Polymeropoulos M.H., Brownstein M.J. [1998]: Alpha synuclein in neurodegenerative disorders: murderer or accomplice? *Nat. Med.*; 4: 755-757.
- Mikolaenko I, Pletnikova O, Kawas CH, O'Brien R, Resnick SM, Crain B, Troncoso JC. [2005]:  $\alpha$ -Synuclein lesions in normal aging, Parkinson disease, and Alzheimer disease: evidence from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J Neuropathol Exp Neurol*; 64: 156-62.
- Morishima-Kawashima M., Ihara Y. [2002]: Alzheimer's Disease: Amyloid Protein and Tau. *J. Neurosci. Res.*; 70: 392-401
- 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
- Nishie M., Mori F., Yoshimoto M., Takahashi H., Wakabayashi K. [2004]: A quantitative investigation of neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the pontine and inferior olivary nuclei in multiple system atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*; 30: 546-554
- Nukina N., Ihara Y. [1986]: One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to Tau protein. *J. Biochem. (Tokyo)*; 99: 1541-44
- Papp M.I., Kahn J.E., Lantos P.L. [1989]: Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of Patients with multiple system atrophy, striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager Syndrom. *J. Neurol. Sci.*; 94: 79-100.
- Perry R.H., McKeith I.G., Perry E.K. [1996]: *Dementia with Lewy Bodies: Clinical, Pathological, and Treatment Issues*, Cambridge University Press, S. 2-5
- Perry R. H, Irving D, Tomlinson B. E [1990]: Lewy body prevalence in the aging brain: relationship to neuropsychiatric disorders, Alzheimer-type pathology and catecholaminergic nuclei. *J Neurol Sci Mar*; 102(1):121.
- 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
- Probst A, Langui D, Ulrich J [1991] Alzheimer's disease. A description of the structural lesions. *Brain Pathol* 1: 229-239

- Revesz T., Gliso J., Lashley T., Plant G., Rostagno A., Frangione B., Holton J.L. [2003]: Cerebral amyloid angiopathies: a pathologic, biochemical, and genetic view. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; Sep 62(9):885-98.
- Rosenberg C.K., Cummings T.J., Saunders A.M., Widico C., McIntyre L.M., Hulette C.M. [2001]: Dementia with Lewy Bodies and Alzheimer's Disease. *Act. Neuropathol.*; 102: 621-626
- Scherzer C.R., Jensen R.V., Gullans S.R., Feany M.B. [2003]: Gene expression changes presage neurodegeneration in a drosophila model of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.*; 12: 2457-2466
- Schmitt F.A., Davis D.G., Wekstein D.R., Smith C.D., Ashford J.W., Markesbery W.R. [2000]: Neuropathology of cognitively normal older adults. *Neurology*; 55: 370-376
- Sharon R., Bar-Joseph I., Mirick G.E., Serhan C.N., Selkoe D.J. [2003]: Altered fatty acid composition of dopaminergic neurons expressing  $\alpha$ -synuclein and human brains with  $\alpha$ -synucleinopathies. *J. Biol. Chem.*; 278: 49874-49881
- Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R., Hasegawa M., Goedert M. [1998]: Filamentous  $\alpha$ -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.*; 251: 205-208
- 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): 37-4
- Takeda A., Hashimoto M., Mallory M., Sundsumo M., Hansen L., Sisk A., Masliah E. [1998]: Abnormal distribution of the non-A $\beta$  component of Alzheimer's disease amyloid precursor/a-synuclein in Lewy body disease as revealed by proteinase K and formic acid pretreatment. *Lab Invest*; 78: 1169-1177
- Takeda A., Hashimoto M., Mallory M., Sundsumo M., Hansen L., Masliah E. [2000]: C-terminal a-synuclein immunoreactivity in structures other than Lewy bodies in neurodegenerative disorders, *Acta Neuropathol.*; 99: 296-304.
- Takeda A., Mallory M., Sundsmo M., Honer W., Hansen L., Masliah E. [1998]: Abnormal accumulation of NACP/a-synuclein in neurodegenerative disorders. *Am. J. Pathol.*; 152: 367-372
- Tamo W., Imaizumi T., Tanji K., Yoshida H., Mori F., Yoshimoto M., Takahashi H., Fukuda I., Wakabayashi K., Satoh K. [2002]: Expression of a-synuclein, the precursor of non-amyloid component of Alzheimer's disease amyloid, in human cerebral blood vessels. *Neurosci. Lett.*; 326: 5-8
- Thal D.R., Braak H. [2005]: Postmortale Diagnosestellung beim Morbus Alzheimer. *Pathologe*; 26: 201-213.
- Thal D.R., Rüb U., Schultz C., Sassin I., Ghebremedhin E., Del Tredici K., Braak E., Braak H. [2000]: Sequence of A $\beta$  deposition in the human medial temporal lobe. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 59: 733-758
- Uéda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D.A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T. [1993]: Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognised component of amyloid in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 90: 11282-11286
- Uéda K., Saitoh T, Mori H. [1994]: Tissue-dependent alternative splicing of mRNA for NACP, the precursor of non-A  $\beta$  component of Alzheimer's disease amyloid. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*; 205: 1366-1372
- Uversky V.N. [2007]: Neuropathology, biochemistry and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.*; 103: 17-37
- Vinters H.V., Partridge W.M. [1986]: The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Can. J. Neurol. Sci.*; 13 (4Suppl.): 446-448

- Wakabayashi K., Matsumoto K., Takayama K., Yoshimoto M., Takahashi H. [1997]: NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.*; 239: 45–48
- Wakabayashi K., Yoshimoto M., Tsuji S., Takahashi H. [1998]:  $\alpha$ -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.*; 249: 180–182
- Wakako T., Tadaatsu I., Kunikazu T. [2002]: Expression of  $\alpha$ -synuclein, the precursor of non-amyloid component of Alzheimer's disease amyloid, in human cerebral blood vessels. *Neurosci. Lett.* 326: 5–8
- 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: 548- 556
- Wenning GK, Jellinger KA. [2005]: The role of  $\alpha$ -synuclein and tau in neuro - degenerative movement disorders. *Curr Opin Neurol.*; 18: 357–62.
- Wischik C.M., Novak M., Thogersen H.C., Edwards P.C., Runswick M.J., Jakes R., Walker J.E., Milstein C., Roth M., Klug A. [1988]: Isolation of a fragment of Tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 85: 4506-4510.
- Woodard J. S. [1962]: Concentric hyaline inclusion body formation in mental disease analysis of twenty-seven cases. *J Neuropathol Exp Neurol.* Jul; 21: 442-9.
- 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]: 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]: Localisation 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

Daphne Eschbach

## 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 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.