

Aus der Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Faßbender
Universitätsklinikum Homburg/Saar
Kirrberger Straße 100
66424 Homburg/Saar

Korrelation von Serumproteinen mit Amyloidablagerung im gesunden und Alzheimer erkrankten Hirnparenchym

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
in Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Homburg/Saar vorgelegt von

Jörn Müller aus Sittard/NL
Homburg, 2010

1 Zusammenfassung

Die Alzheimer'sche Erkrankung ist als häufigste Demenzform im Rahmen der derzeitigen demographischen Entwicklung in den Industrieländern Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Die ursächliche Pathologie der Erkrankung ist die Entstehung amyloider Plaques, die in humanem Hirngewebe *post mortem* nachgewiesen werden konnten. Dennoch können die Plaques, welche auch in Gehirnen von nicht an AD leidenden Individuen nachgewiesen werden konnten, isoliert nicht für die vollständige Erklärung der Pathogenese verantwortlich gemacht werden. In dieser Arbeit wurde ein erster Schritt unternommen, die extrazelluläre Matrix, die die Rahmenbedingungen für sämtliche Stoffwechsellleistungen des menschlichen Gehirns darstellt, anhand von vergleichenden Analysen verschiedener Proteine zu untersuchen.

Mit Hilfe immunhistochemischer Analysen von *post mortem*-entnommenen humanem Hirngewebe wurden Neurone und Gliazellen auf Positivität für die Serumproteine Albumin, Fibrinogen, α 1-anti-Chymotrypsin und α 1-saures-Glykoprotein untersucht. Dabei wurde im Rahmen einer semiquantitativen mikroskopischen Analyse gezeigt, dass die Anzahl der positiv angefärbten Neurone und Gliazellen bei AD-Patienten im Vergleich zu hirngesunden Kontrollgruppen signifikant erhöht war.

Es wurde ebenfalls festgestellt, dass es offensichtlich keinerlei räumlichen Zusammenhang zwischen Zellen mit Positivität für eines der genannten Proteine und amyloiden Plaques gibt. Die Ergebnisse deuten also eher auf eine generalisierte Transportproblematik mit zentraler Beteiligung der den Hirnstoffwechsel organisierenden Komponenten der EZM hin. Eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Proteine, den amyloiden Plaques und einer Neuronenschädigung konnte nicht getroffen werden. Es liegt auf der Hand, dass die A β -Plaques, trotz ihrer *in vitro* nachgewiesenen neuronalen Toxizität nicht allein in der Lage sind, die neuronale Degeneration zu erklären.

Es ist jedoch bekannt, dass A β -Plaques auch bei nicht als AD-Patient klassifizierten Individuen nachgewiesen werden können. Daher ist es in Zukunft entscheidend, den pathogenetischen Horizont in Bezug auf die AD auch auf andere Bereiche zu erweitern. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass - nach heutigem Wissensstand - ausschließlich peripher synthetisierte Serumproteine eindeutig im menschlichen Gehirn vorkommen. Die genaue Herkunft der Proteine ist allerdings nicht endgültig aufgeklärt. Eine intrazerebrale Genese konnte bis heute weder widerlegt noch bewiesen werden. In jedem Fall erscheint es logisch, dass die Proteine eine Funktion wahrnehmen

und mitnichten erst nach dem Eintritt einer nichtphysiologischen Situation ins Hirnparenchym oder in neuronale Zellen gelangen. Der EZM, die die Rahmenbedingungen für sämtliche Stoffwechselprozesse und interzellulären Interaktionen im ZNS schafft, kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu, der in Zukunft, auch in Bezug auf andere zerebrale Pathologien, mehr Beachtung geschenkt werden sollte.

1 Summary

Correlation of serum proteins with amyloid deposit in healthy and Alzheimer brain parenchyma

Alzheimer's Disease, as the most frequent form of dementia in the course of demographic development in the industrialised countries, is currently subject to many research projects. Its causal pathology is the formation of amyloid plaques, which can be detected in brain tissue *post mortem*. Yet, these plaques, which can also be found in brains of individuals not carrying AD, cannot solely explain the etiology. In this project a first path was taken to take the extracellular matrix, responsible for all general conditions in which brain metabolism takes place, into the equation by comparing analysis of different proteins.

With the help of immunohistochemical analysis of brain tissue extracted *post mortem*, neurons and glial cells were tested for positivity of serumproteins, more specifically for albumin, fibrinogen, α 1-antichymotrypsin and α 1-acid glycoprotein. Thus, in a semiquantitative microscopic analysis, it appeared that the number of positively dyed neurons and glial cells was significantly higher in the group of AD-patients than in the control group of brain-healthy individuals. Secondly, the examined brain tissue delivered evidence that there is no spatial coherence of cells positive for the named proteins and amyloid plaques. These results rather point towards a more general interference of the brain's metabolism with components of the extracellular matrix centrally disturbed. There was no evidence however for a correlation between the presence of the examined proteins, amyloid plaques and neuronal damage. Still, it remains obvious that senile plaques, despite their neuronal toxicity *in vitro*, cannot solely explain neuronal degeneration.

As it is known, abeta-plaques can also be shown in patients not classified as having Alzheimer's Disease. Therefore it will be crucial to future research to widen the pathogenetical horizon regarding Alzheimer's Disease to other fields.

In the work, we showed for the first time that – at least up to today's state of knowledge - serumproteins exclusively synthesized peripherally can be found in the human brain. Exact provenance of these proteins however is not finally explored yet. An intracerebral genesis still hasn't been neither contradicted nor proven. In either case it seems logical, that these proteins fulfill a function and by no means only enter the brain parenchyma or the neuronal cells due to a non-physiological situation. The extracellular matrix, being responsible for the establishment of the basic conditions for cellular interaction in the central nervous system, clearly plays a major role in this interplay. Therefore, more attention should be paid to it in the future, regarding Alzheimer's Disease as well as other cerebral pathologies.

Abkürzungsverzeichnis

aaC	α 1-anti-Chymotrypsin
Abb.	Abbildung
A β	Amyloid beta
AD	Alzheimer Demenz
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ApoE	Apolipoprotein E
AP	Alkalische Phosphatase
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
ca.	circa
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et aliqui = und andere
EZM	Extrazelluläre Matrix
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobuline der G-Klasse
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSAR	Nicht-steroidale-Anti-Rheumatika
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
RT	Raumtemperatur
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Aufstellung der eingesetzten Antikörper	S. 27
Tabelle 2	Schematische Einteilung der positiven Zellen pro Gesichtsfeld	S. 30
Tabelle 3	α 1-anti-Chymotrypsin: Vergleich hirngesunder > 65-jähriger mit < 65-jährigen Individuen	S. 33
Tabelle 4	Albumin: Vergleich hirngesunder > 65-jähriger mit < 65-jährigen Individuen	S. 39
Tabelle 5	Fibrinogen: Vergleich AD-Patienten mit hirngesunden > 65-jährigen Individuen	S. 44
Tabelle 6	Fibrinogen: Vergleich AD-Patienten mit hirngesunden < 65-jährigen Individuen	S. 44
Tabelle 7	Fibrinogen: Vergleich hirngesunder > 65-jähriger mit < 65-jährigen Individuen	S. 45
Tabelle 8	α 1-saures Glykoprotein: Vergleich AD-Patienten mit hirngesunden > 65-jährigen Individuen	S. 48
Tabelle 9	Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Proteine und deren Vorkommen im Hippocampus	S. 54
Tabelle 10	Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Proteine und deren Vorkommen im Kortex	S. 55
Abbildung 1	Blut-Hirn-Schranke	S. 10
Abbildung 2	Bevölkerungsprojektion	S. 12
Abbildung 3	Auguste Deter	S. 13
Abbildung 4	Alois Alzheimer	S. 13
Abbildung 5	Kortex: Verteilung α 1-Chymotrypsin-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 34
Abbildung 6	Hippocampus: Verteilung α 1-Chymotrypsin-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 34
Abbildung 7	Kortex: Verteilung α 1-Chymotrypsin-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 35
Abbildung 8	Hippocampus: Verteilung α 1-Chymotrypsin-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 35
Abbildung 9	Kortex eines an AD-erkrankten Patienten mit α 1-Chymotrypsin-positiven Neuronen, Gliazellen und A β -Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 36
Abbildung 10	Kortex eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit α 1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 36
Abbildung 11	Kortex eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit α 1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 36

Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

Abbildung 12	Hippocampus eines an AD-erkrankten Patienten mit α 1-Chymotrypsin-positiven Neuronen, Gliazellen und A β -Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 37
Abbildung 13	Hippocampus eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit α 1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 37
Abbildung 14	Hippocampus eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit α 1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 37
Abbildung 15	Kortex: Verteilung Albumin-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 40
Abbildung 16	Hippocampus: Verteilung Albumin-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 40
Abbildung 17	Kortex: Verteilung Albumin-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 41
Abbildung 18	Hippocampus: Verteilung Albumin-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 41
Abbildung 19	Kortex eines an AD-erkrankten Patienten mit Albumin-positiven Neuronen, Gliazellen und A β -Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 42
Abbildung 20	Kortex eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 42
Abbildung 21	Kortex eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 42
Abbildung 22	Hippocampus eines an AD-erkrankten Patienten mit Albumin-positiven Neuronen, Gliazellen und A β -Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 43
Abbildung 23	Hippocampus eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 43
Abbildung 24	Hippocampus eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S. 43
Abbildung 25	Kortex: Verteilung Fibrinogen-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 46
Abbildung 26	Hippocampus: Verteilung Fibrinogen-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 46
Abbildung 27	Kortex: Verteilung Fibrinogen-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 47
Abbildung 28	Hippocampus: Verteilung Fibrinogen-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S. 47

Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

Abbildung 29	Kortex: Verteilung α 1-saures-Glykoprotein-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S.	50
Abbildung 30	Hippocampus: Verteilung α 1-saures-Glykoprotein-positiver Gliazellen von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S.	50
Abbildung 31	Kortex: Verteilung α 1-saures-Glykoprotein-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S.	51
Abbildung 32	Hippocampus: Verteilung α 1-saures-Glykoprotein-positiver Neurone von AD-Patienten, gesunden > 65-jährigen und < 65-jährigen Individuen	S.	51
Abbildung 33	Kortex eines an AD-erkrankten Patienten mit α 1-saures-Glykoprotein-positiven Neuronen, Gliazellen und A β -Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S.	52
Abbildung 34	Kortex eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit α 1-saures-Glykoprotein-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S.	52
Abbildung 35	Kortex eines hirngesunden > 65-jährigen Patienten mit α 1-saures-Glykoprotein-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung	S.	52

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	S. 1
	Summary	S. 2
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	S. 4
	Verzeichnis der verwendeten Abbildungen und Tabellen	S. 5
	Inhaltsverzeichnis	S. 8
2	Einleitung	S. 10
2.1	Physiologisches Altern	S. 10
2.2	Demenzen als pathologische Altersveränderungen	S. 13
2.3	Die Alzheimer'sche Erkrankung	S. 13
2.3.1	Symptomatik, Diagnostik und histopathologische Merkmale der AD	S. 14
2.3.2	Therapie der AD	S. 17
2.3.3	Pathophysiologie der AD	S. 18
2.4	Die extrazelluläre Matrix	S. 20
2.4.1	Veränderungen der EZM bei der AD	S. 21
2.5	Untersuchte Serumproteine	S. 22
2.5.1	Albumin	S. 22
2.5.2	Fibrinogen	S. 23
2.5.3	α 1-saures-Glykoprotein	S. 23
2.5.4	α 1-anti-Chymotrypsin	S. 24
2.6	Fragestellung	S. 24
3	Material und Methoden	S. 26
3.1	Gewebe	S. 26
3.2	Geräte	S. 26
3.3	Antikörper	S. 27
3.4	Präparation des Gewebes	S. 28
3.5	Immunhistologische Analysen	S. 28
3.5.1	DAB	S. 28
3.5.2	Neufuchsin	S. 28
3.6	Färbung mit Albumin, Fibrinogen, α 1-anti-Chymotrypsin und α 1-saurem Glykoprotein	S. 29
3.7	Co-Färbung mit A β	S. 30
3.8	Mikroskopische Auswertung	S. 30
3.9	Statistische Auswertung	S. 31
4	Ergebnisse	S. 32
4.1	Semiquantitative Analyse der Expression von Plasmaproteinen bei AD-Patienten im Vergleich zum > 65-jährigen und < 65-jährigen hirngesunden Menschen	S. 32
4.1.1	Immun histochemische Analyse von α 1-anti-Chymotrypsin	S. 32
4.1.2	Immun histochemische Analyse von Albumin	S. 38
4.1.3	Immun histochemische Analyse von Fibrinogen	S. 44

Inhaltsverzeichnis

4.1.4	Immunhistochemische Analyse von α 1-saurem Glykoprotein	S. 48
4.2	Lokalisation und Verteilung der positiven Zellen	S. 53
5	Diskussion	S. 54
5.1	α 1-anti-Chymotrypsin	S. 55
5.2	Albumin	S. 56
5.3	Fibrinogen	S. 57
5.4	α 1-saures Glykoprotein	S. 57
5.5	Die extrazelluläre Matrix	S. 58
5.6	Zusammenfassung und Perspektiven	S. 59
6	Literaturverzeichnis	S. 61
7	Danksagung	S. 68
8	Lebenslauf	S. 69

2 Einleitung

2.1 Physiologisches Altern

Die menschliche Lebenserwartung in den Industrienationen liegt aktuell bei über 80 Jahren.

Der heutige Kenntnisstand über das physiologische Altern besagt jedoch, dass bereits vor Beginn des dreißigsten Lebensjahres erste Alterungsprozesse einsetzen. Als eine der primären Ursachen für den allmählichen körperlichen Funktionsverlust gilt die Reaktion hochaggressiver Radikale mit Körpergewebe, der sog. oxidative Stress (Fukagawa, 1999).

Unter oxidativem Stress versteht man die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen während des Alterungsprozesses, die mit Proteinen, Lipiden oder DNA reagieren und diese verändern können.

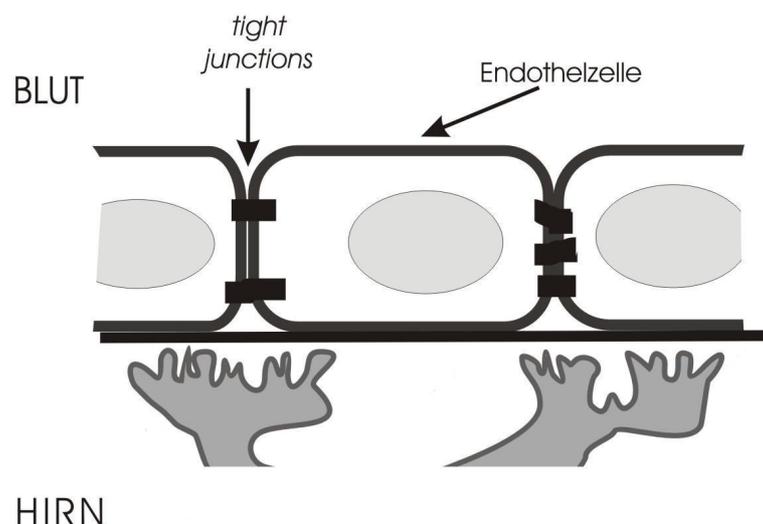


Abb. 1: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (Abb. 1) dient zum Schutz des empfindlichen Nervengewebes des ZNS. Im Wesentlichen besteht sie aus Endothelzellen der Kapillaren des Gehirns, die durch „tight junctions“ eng miteinander verbunden sind und dadurch den vesikulären Transport durch jene Zellen einschränken (Jacobs, 1978). Im höheren Lebensalter erhöht sich die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke signifikant, was auf ein Nachlassen der Schrankenfunktion hindeutet (Pakulski, 2000). Ein totaler Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führt zu neuronaler Degeneration (Jacobs, 1978).

Im Maus-Modell kommt es in bestimmten Hirnarealen zu einem signifikanten Neuronenverlust während des physiologischen Alterns (Sturrock, 1989). Ebenso ist das menschliche Gehirn wie auch die anderen Organe des Körpers hinsichtlich der Neuronenzahl, der neuronalen Verknüpfungen und weiterer Merkmale von Alterungsprozessen betroffen. So kommt es in bestimmten Hirnregionen im Verlauf des Alterns zu einem Neuronenuntergang, welcher als physiologisch angesehen wird.

Die Zahl der Neurone im menschlichen ZNS wird auf mindestens 10^{11} geschätzt. Sie sind umgeben von Gliazellen, deren Anzahl die der Neurone um das ca. 10 bis 50-fache übersteigt. Die Zahl der Astrozyten fällt mit steigendem Alter nur leicht ab, während sich in den anderen Gliazellreihen parallel zum Neuronenverlust eine signifikante Abnahme findet (Lasn et al., 2006). Im höheren Lebensalter kommt es zu einer vermehrten Aktivierung von Gliazellen im ZNS (diPatre et al., 1997). Dies kann zum einen als neuroinflammatorischer Prozess (Conde et Streit, 2006), zum anderen als Zeichen einer dystrophischen Veränderung der Gliazellen, interpretiert werden (Streit et al., 2004).

In Verbindung mit den erwähnten Altersveränderungen des Gehirns verändern sich die Hirnfunktionen: Dabei sind vor allem, allerdings nicht allein, kognitive Leistungen zu nennen. Ein Nachlassen kognitiver Leistungen im Alter wird von einem gewissen Ausmaß an als pathologisch aufgefasst, spätestens bei einer Beeinträchtigung der selbstständigen Lebensführung. Beim Patienten wird zuerst eine leichte kognitive Störung diagnostiziert, die mit zunehmendem Lebensalter in eine Demenz münden kann.

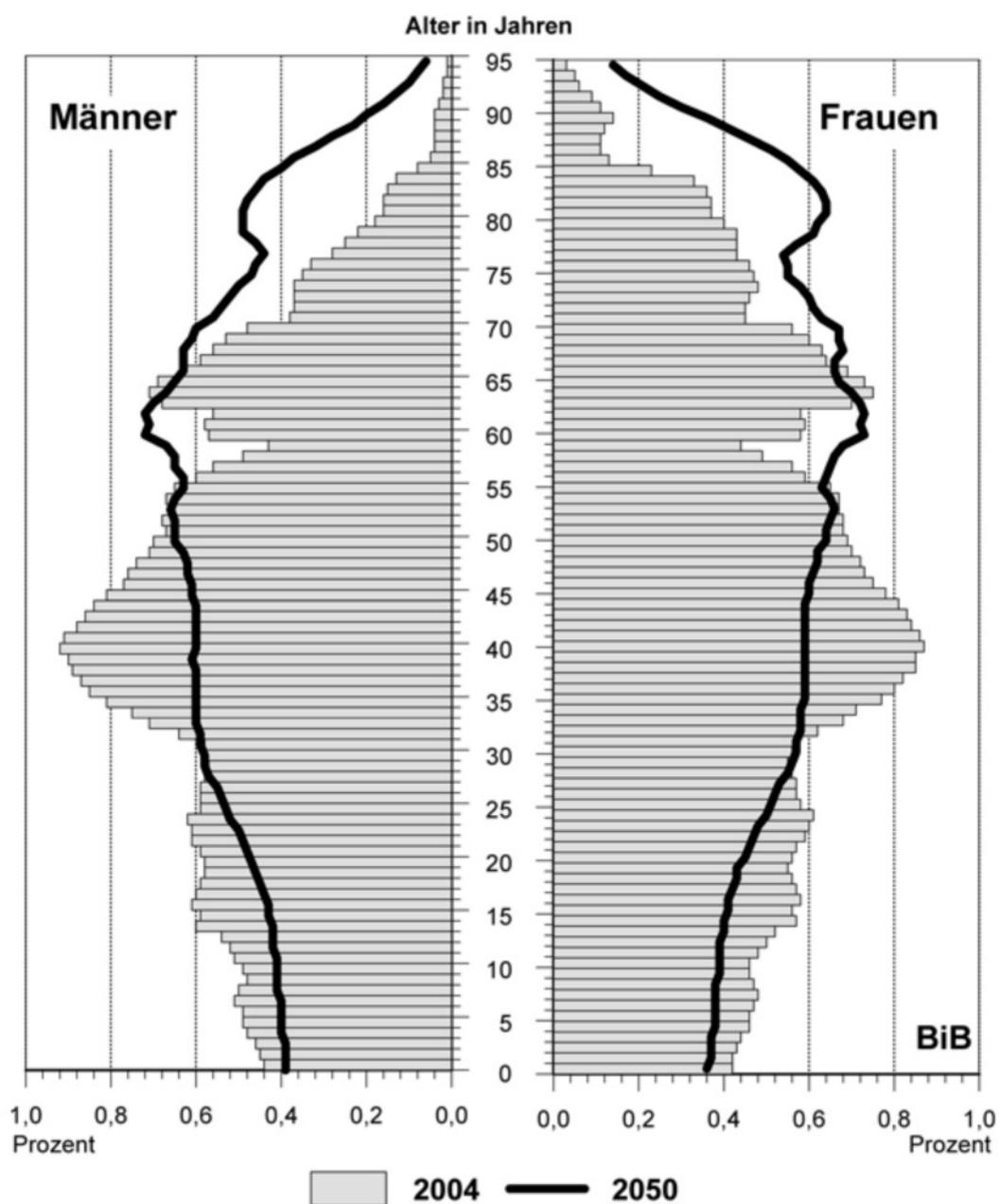


Abb. 2: Bevölkerungsprojektion für die Bundesrepublik Deutschland von 2004 (Querbalken) mit Prognose für 2050 (schwarze Linie). Es zeigt sich eine für Industrienationen typische Altersverteilung (Quelle: Statistisches Bundesamt).

2.2 Demenzen als pathologische Altersveränderungen

Demenz wird definiert als fortschreitende kortikale und/oder subkortikale Atrophie des Hirnparenchyms. Dabei ist die Demenz von der physiologischen Involution zu unterscheiden. In Deutschland sind ca. 7% der über 65-jährigen dement (Bickel, 2001). Nach heutigem Kenntnisstand leiden mehr als 50% dieser Patienten an der sog. Alzheimer-Demenz, welche damit die Hauptursache für dementielle Erkrankungen darstellt. Ihre Prävalenz korreliert direkt mit dem Lebensalter (Katzman, 1988). Weitere Demenzformen sind die vaskuläre Demenz (ca. 20% der Fälle) und verschiedene seltenere Demenzformen, wobei davon ausgegangen wird, dass es sich dabei häufig um Mischformen handelt. Aufgrund der demographischen Entwicklung (Abb. 2) mit steigender Lebenserwartung wird den Demenzerkrankungen in Zukunft eine immer größer werdende Rolle auch in sozioökonomischer Hinsicht zukommen.

2.3 Die Alzheimer'sche Erkrankung (AD)

Beschrieben wurde die AD erstmals 1907 von dem deutschen Neuropathologen und Psychiater Alois Alzheimer (Abb. 4), der bei seiner Patientin Auguste Deter (Abb. 3) eine „eigentümliche Erkrankung der Hirnrinde“ feststellte (Alzheimer, 1907). Die Patientin litt sowohl an einer zeitlichen als auch örtlichen Desorientiertheit, einer gravierenden Persönlichkeitsveränderung und Stimmungsschwankungen. 100 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung rechnen Demographen für das Jahr 2050 mit über 2 Millionen Betroffenen (Bickel, 2001).

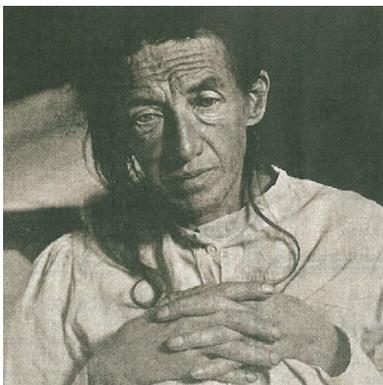


Abb. 3: Auguste Deter



Abb. 4: Alois Alzheimer

Die Ursache der AD konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Gendefekte auf den Chromosomen 1, 14 und 21 konnten in einem kleinen Teil der Fälle nachgewiesen werden (Clark, 1993). Meist handelt es sich um Mutationen des Presenilin-1-Gens, das sich auf Chromosom 14 befindet. Es sind bereits mehr als 100 Mutationen beschrieben wurden. Ebenso konnte eine Assoziation zwischen der AD und der Trisomie-21 gezeigt werden (Karlinsky, 1986). Auf dem beim Down-Syndrom dreifach vorhandenen Chromosom 21 befindet sich das für das Amyloid-Vorläufer-Protein codierende Gen. Betroffene Individuen erkranken zu einem deutlich früheren Zeitpunkt. Diese familiären Fälle der AD, bei denen es zu einer Überproduktion von Amyloidpeptid kommt, sind aber eindeutig von den sporadischen Fällen abzugrenzen.

Die eigentliche Pathogenese der sporadischen AD konnte bisher noch nicht endgültig geklärt werden.

2.3.1 Symptomatik, Diagnostik und histopathologische Merkmale der AD

Im Vordergrund stehen initial Störungen der Merkleistung und Orientierung, insbesondere das Kurzzeitgedächtnis ist betroffen. Weiterhin fällt bei der Anamnese eine Beeinträchtigung des abstrakten Denkens auf. Geeignete neuropsychologische Testverfahren hierfür sind der Mini-Mental-Status-Test (Folstein et al., 1975) und die spezifischere Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS-cog), die auch zur Verlaufskontrolle der Krankheitsprogredienz eingesetzt wird (Mohs et Cohen, 1988). Zusätzlich kann eine diskrete akinetisch-rigide Symptomatik auftreten.

In der Elektroenzephalographie zeigen sich ein verlangsamter Grundrhythmus und ein Anstieg der relativen Theta-Aktivität (Coben et al., 1995). Im Computertomogramm erscheint das Hirngewebe atrophiert und die Liquorräume vergrößert. Die gewebesensitivere Magnetresonanztomographie zeigt zusätzlich noch eine akzentuierte Hippocampusatrophie. In der Positronen-Emissions-Tomographie und in der Single Photon Computed Emission Tomography erkennt man eine globale Reduktion der zerebralen Durchblutung und des Glukosemetabolismus, welche mit dem Schweregrad der Demenz korrelieren. Im Liquor kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration von A β -Antikörpern und des Tau-Proteins, während A β selbst erniedrigt ist (Kosik, 1986, Delacourte, 1986).

Das Tau-Protein bildet den Hauptbestandteil der intrazellulären Neurofibrillenbündel. Diese Bündel sind charakteristische histopathologische Merkmale der AD und bestehen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Das Tau-Protein gehört zur Gruppe der mikrotubuli-assoziierten Proteine, welche eine wichtige Rolle bei deren Stabilisierung und Dynamik spielen (Goedert et al., 1991) und den axoplasmatischen Flux gewährleisten. Die Dynamik der extrazellulären Matrix (EZM) ist von der Zellumgebung abhängig und entsteht durch fokale Adhäsionen und Kontraktion von Filamenten. Infolge der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins kommt es zur Labilisierung der Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und Tau-Protein.

Deutlichstes histopathologisches Kennzeichen der AD ist die Anwesenheit einer großen Zahl an amyloiden Plaques und jener neurofibrillärer Bündel bei gleichzeitiger Neurodegeneration. Diese typischen extrazellulär abgelagerten Alzheimer-Amyloid- β -Plaques werden in „reife“ - senile Plaques und „unreife“ - diffuse Plaques eingeteilt. Senile Plaques sind extrazelluläre Ablagerungen und bestehen größtenteils aus dem 40 Aminosäuren-langen A β 40. Im Gegensatz hierzu findet sich in diffusen Plaques überwiegend das aus 42 Aminosäuren bestehende A β 42. Die diffusen Plaques sind schon in frühen Stadien der Alzheimer-Demenz zu finden und werden als Vorläuferläsionen der senilen Plaques angesehen, da sie keine pathologisch veränderten Neuriten enthalten und nur in geringem Ausmaß kondensiert sind. Die „reifen“ Plaques treten gewöhnlich erst im späteren Verlauf der Alzheimer-Demenz in großer Zahl auf. Innerhalb dieser Amyloidablagerungen und in deren unmittelbarer Umgebung befinden sich dystroph veränderte Neuriten. Diese sind durch ultrastrukturelle Veränderungen, einschließlich vergrößerter Lysosomen, zahlreicher Mitochondrien und paarig helikaler Filamente gekennzeichnet. Wie lange die Ausbildung einer solchen neuritischen Plaque dauert und welcher Mechanismus zu einer Umwandlung der diffusen in senile Plaques führt, ist nicht bekannt (Selkoe, 2001).

Das Amyloid- β -Peptid entsteht aus einem Protein, dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP), welches zu den transmembranären Glykoproteinen gehört (Kang et al., 1987). APP, in der Zellmembran lokalisiert, besitzt einen extra- und einen intrazellulären Anteil und ist entscheidend bei der Vermittlung von neuronalen Zell-Zell-Kontakten und der Zelladhäsion beteiligt (Breen et al., 1991). APP interagiert mit der extrazellulären Matrix und dabei in erster Linie mit dem Proteoglykan Heparansulfat, aber auch mit Laminin und Kollagen Typ IV (Caceres, 1997).

Es kann von mehreren Sekretasen gespalten werden. Deren wichtigste Vertreter sind die α -, β - und γ -Sekretase (Hartmann, 1999). Je nach Sekretase entstehen verschiedene Zwischenprodukte. Die durch die β - und γ -Sekretase gebildeten A β -Peptide variieren in ihrer Länge. Es existieren die beiden oben beschriebenen Varianten. Zum einen das 40 Aminosäuren lange A β -40, welches den größeren Teil der gebildeten Peptide ausmacht, und das 42 Aminosäuren lange A β -42. Dies ist von zentraler pathologischer Bedeutung, da das längere A β -42 eine deutlich höhere Aggregationstendenz aufweist (Younkin, 1995). Nervenzellen besitzen die größte bisher beobachtete APP-Menge. Dies könnte die Gehirnspezifität der AD erklären, da die Regenerationsfähigkeiten des Gehirns und dessen Möglichkeiten geschädigte Zellen zu ersetzen begrenzt sind.

Die Neurodegeneration bei der AD ist sehr ausgeprägt und zeigt eine deutliche Bevorzugung bestimmter Hirnregionen und Neuronentypen. Finden sich in einigen Hirnregionen auch im Spätstadium der AD kaum oder keine Veränderungen, ist in anderen Arealen ein Untergang von mehr als einem Drittel der Nervenzellen zu verzeichnen (Lasn et al., 2001). Besonders frühzeitig lässt sich eine Neurodegeneration in limbischen und paralimbischen Regionen wie im cholinergen Projektionssystem des basalen Vorderhirns, im enthorinalen Kortex und im Hippocampus nachweisen.

Der Hippocampus zählt zu den evolutionär ältesten Regionen des Gehirns. Es ist eine der Hirnregionen, in denen auch noch zur Lebenszeit Neurogenese stattfindet. Eine mögliche Verknüpfung zwischen einer Störung dieser Regeneration und der AD wird diskutiert (Elder et al., 2006). Definitiv kommt es im Hippocampus im Verlauf der AD zu einem signifikanten Neuronenverlust im Vergleich zum normal alternden Menschen (Simic et al., 1997). Außerdem wurde in einer ähnlichen Studie nachgewiesen, dass der hippocampale Neuronenverlust mit dem Schweregrad der Demenz korreliert (Bobinski et al., 1997). Im Modellversuch mit transgenen Mäusen zeigte sich jedoch, dass der Untergang von Nervenzellen die Amyloidplaquebelastung sogar übersteigt (Schmitz et al., 2004). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Plaques nicht allein für den hippocampalen Zellverlust verantwortlich sind. Hierbei kommt der extrazellulären Matrix des Hippocampus eine besondere Bedeutung zu. Es wurde festgestellt, dass im Hippocampus von Mäusen nach Exzitotoxininfusion eine Interaktion zwischen Laminin, einem Glykoprotein der extrazellulären Matrix und Neuronen den Untergang von Nervenzellen verhindern kann (Chen et al., 2003).

Ganz allgemein ist festzustellen, dass die regionalen Unterschiede in der Verteilung der neurodegenerativen Prozesse der neuronalen Vulnerabilität folgen. Das heißt, ein hoher Grad an neuronaler Plastizität bedingt offenbar gleichzeitig eine hohe neuronale Vulnerabilität (Braak et al., 2000). Umfangreiche Teile des Gehirns erleiden bis zum Vollbild der AD keine Veränderungen oder zeigen nur geringfügige Schäden. Der pathologische Prozess bei der AD schreitet unaufhaltsam voran, zeigt keinerlei Remissionen und bietet keine Möglichkeit zur spontanen Ausheilung. Wenn nun im folgenden Abschnitt von Therapiemöglichkeiten gesprochen wird, sind dies keine kurativen, sondern entweder rein symptomatische oder den Krankheitsprozess verzögernde Ansätze.

2.3.2 Therapie der AD

Bis heute gibt es im Prinzip nur zwei medikamentöse Ansätze in der Therapie von dementiellen Erkrankungen. Zum einen die Gabe von Cholinesteraseinhibitoren, welche die Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt erhöhen und damit die Verminderung cholinergischer Neurone ausgleichen. Acetylcholin-Konzentrationen im Liquor von AD-Patienten sind im Vergleich zu gesunden Individuen signifikant erniedrigt (Jia et al., 2004). Zum anderen die NMDA-Rezeptor-Antagonisten, die eine Überstimulation jener Rezeptoren verhindern, was unbehandelt zu Exzitotoxizität und neuronaler Degeneration führen kann (Gauthier et al., 2006). In Studien konnte gezeigt werden, dass eines oder beide Medikamente die Symptome Demenzkranker lindern können (Roberson et Mucke, 2007).

Im Mausmodell wurde nach Impfung gegen A β eine Reduzierung der Plaquebelastung durch Bildung von Antikörpern gegen A β_{42} nachgewiesen (Qu et al., 2006) und es konnte gezeigt werden, dass die Integrität der Blut-Hirn-Schranke nach Auflösung der Plaques wiederhergestellt wird (Dickstein et al., 2006). Eine klinische Studie mit aktiv-geimpften menschlichen Patienten wurde gestoppt, nachdem bei 6% dieser Patienten eine T-Zell-vermittelte Meningoenzephalitis auftrat (Schenk, 2002).

Allerdings konnte in mehreren Studien mit Hilfe von Demenztests die Wirksamkeit von nichtmedikamentöser Therapie in Form von Gedächtnistraining nachgewiesen werden. Selbst eine einstündige täglich systematisch durchgeführte Aktivierung durch Angehörige führt zu messbaren Verbesserungen der kognitiven Leistungen (Quayhagen et al., 1995).

Der entscheidende Durchbruch in der Therapie der AD ist bisher noch nicht gelungen (Becker et Greig, 2008). Essentiell für eine erfolgreiche Therapie ist ein grundsätzliches Verständnis

der pathologischen Prozesse, die im erkrankten Organismus ablaufen. Im nächsten Abschnitt wird dargestellt, dass neben der Ablagerung von Amyloidpeptid auch noch andere Pathomechanismen zeitgleich ablaufen und die Progredienz der AD beeinflussen.

2.3.3 Pathophysiologie der AD

Gegen eine direkt und ausschließlich mit den A β -Plaques verknüpfte Pathogenese der AD spricht, dass A β -Plaques mitnichten pathognomonisch für eine AD sind, sondern ebenfalls im physiologischen Alterungsprozess entstehen. Man vermutet daher eher, dass die starke Korrelation zwischen AD und A β auf eine Beschleunigung der neuronalen Degeneration hindeutet (Davies et al., 1988). Es konnte bisher jedoch keine Assoziation zwischen Plaquelokalisation und Neuronenuntergang nachgewiesen werden (Schmitz, 2004).

Allerdings wirken A β -Plaques *in vitro* toxisch auf Nervenzellen (Pike et al., 1991). Der Mechanismus der toxischen Wirkung ist noch nicht endgültig geklärt. Man vermutet, dass lösliche Bestandteile des A β -Komplexes, sog. A β -Oligomere, an verschiedenen Punkten der interneuronalen Signalkaskaden wirken und diese stören (Lambert et al., 1998, Cerpa et al., 2008).

Die Toxizität von A β scheint außerdem von verschiedenen Faktoren beeinflusst zu werden. Dazu gehören Apolipoprotein E (ApoE), Akute-Phase-Proteine, Proteoglykane und Metallionen (Iversen et al., 1995). Beispielsweise senkt $\epsilon 4$, ein Allel des für das Apo-E-codierende Gen, das durchschnittliche Erkrankungsalter und erhöht das Erkrankungsrisiko bei Patienten mit vorbestehender Arteriosklerose deutlich (Hofman et al., 1997). Im Maus-Modell zeigen ApoE-Knockout-Tiere eine deutlich verringerte Plaquebildung (Bales et al., 1997). In einer neueren Studie wird jedoch postuliert, dass ApoE die proteolytische Spaltung von bestehenden A β -Plaques begünstigt (Jiang et al., 2008).

Ebenfalls interessant erscheinen die vielen positiven Korrelationen zwischen stattfindenden Entzündungsreaktionen und der Alzheimer-Pathologie. Der wohl populärste Entzündungsmarker, das C-reaktive Protein, findet sich vermehrt in Hippocampusformationen von *post mortem* untersuchten AD-Gehirnen (McGeer, 2001). In Serum und Liquor von AD-Patienten wurden signifikant höhere Konzentrationen des Akute-Phase-Proteins $\alpha 1$ -anti-Chymotrypsin (aaC) nachgewiesen (Lieberman, 1995, Harigaya, 1995, Dik et al., 2005).

Erhöhte Plasmaspiegel von Fibrinogen und eben jenem aaC konnten als Risikofaktoren einer Demenzerkrankung erfasst werden (Engelhart et al., 2004, van Oijen, 2005). In retrospektiven Studien mit dem nicht-steroidalen Entzündungshemmer (NSARs) Ibuprofen konnte gezeigt werden, dass eine generalisierte Inflammationsprophylaxe die AD-Inzidenz signifikant senken kann (in't Veld, 2000). Neben einem direkten inhibitorischen Einfluss auf die Neuroinflammation, wird daher vermutet, dass eine Behandlung mit NSARs die Sekretase-Aktivität hemmt (Weggen, 2003).

Ein auch an die Entzündungstheorie anknüpfender Mechanismus ist die Vermittlung der Neuroinflammation durch sogenannte Toll-like-Rezeptoren, die eine wichtige Rolle in der Funktionsweise der angeborenen Immunität spielen (Heine, 2003, Walter et al., 2007). Ebenso konnte bewiesen werden, dass A β das Komplementsystem aktiviert und damit ein weiteres körpereigenes Abwehrsystem involviert ist (Eikelenboom et Veerhuis, 1996, Rogers et al., 2002). Eine überschießende Immunreaktion zeigt sich auch in der Umgebung der A β -Plaques, wo aktivierte Mikrogliazellen aggregieren und beim Versuch die Läsionen zu phagozytieren benachbarte Neurone zerstören (Rogers et al., 1996).

Die Assoziation zwischen Lebensalter und der AD lässt vermuten, dass oxidativer Stress ein Mechanismus für die Entstehung der AD sein könnte (Perry et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass eine reziproke Beziehung zwischen der Entstehung von A β -Plaques und dem durch oxidativen Stress verursachten Schaden besteht. Mit der Zunahme der Plaques im Krankheitsverlauf nimmt der oxidative Schaden kontinuierlich ab (Nunomura, 2001). Dies deutet auf eine vorwiegend initiale Rolle bei der Entstehung der AD hin. Die Formation von freien Radikalen kann indirekt auch weitere Mechanismen induzieren, die eine Zellschädigung zur Folge haben können. Darunter fällt unter anderem auch die Neuroinflammation, welche ihrerseits wiederum zu einer Verstärkung des oxidativen Stresses führt (Smith et al., 1997).

Verschiedene Amyloid-assoziierte Erkrankungen und damit verbundene Neurodegeneration werden mit einer fehlerhaften Proteinaggregation in Zusammenhang gebracht (Koo, 1999). Man stellt sich vor, dass natürlich vorkommende Proteine akkumulieren und es dabei zu fehlerhaften Faltungen in deren Struktur kommt. Dadurch werden die Proteine unbrauchbar, ändern ihre Funktion und können sogar zytotoxisch wirken (Selkoe, 2003). Ein Beispiel hierfür ist Myoglobin, aus dem sich nach Anlagerung von Polypeptidfragmenten Amyloidfibrillen bilden können (Fändrich et al., 2003).

Dies gilt unter in-vitro-Bedingungen interessanterweise auch für das Akute-Phase-Protein Albumin (Taboada et al., 2006). Eine Verbindung zwischen fehlerhafter Proteinfaltung und Pathologien, die mit einer Neurodegeneration vergesellschaftet sind, gilt als nachgewiesen. Man vermutet, dass es im Frühstadium der jeweiligen Pathologie zu einer fehlerhaften Faltung von Proteinen kommt, die daraufhin akkumulieren und im weiteren Krankheitsverlauf zu unlöslichen Komplexen aggregieren (Ross et Poirier, 2004). Verschiedene klinische Studien untersuchen zurzeit den Einfluss von Medikamenten, die eine Proteinaggregation inhibieren und somit eine Krankheitsprogression aufhalten können (Lansbury et Lashuel, 2006).

Albumin und andere Proteine der extrazellulären Matrix wurden als Bestandteile der Plaques identifiziert. Daher wird sich der nächste Abschnitt konkret mit der extrazellulären Matrix und ihren physikochemischen Eigenschaften befassen.

2.4 Die extrazelluläre Matrix

Die EZM stellt die Gesamtheit aller Makromoleküle dar, die sich außerhalb der Plasmamembran von Zellen in Geweben und Organen befinden. Abhängig vom Gewebetyp können sich extrazelluläre Matrices weitgehend unterscheiden. Eine extrazelluläre Matrix kommt grundsätzlich in allen vier Grundgewebetypen (Epithel-, Muskel-, Nerven- und Binde- und Stützgewebe) vor. Ihre Funktionen und Aufgaben sind u.a. Formgebung von Organen, interzelluläre Signaltransduktion, Verankerung und Polaritätsvorgabe für Zellen und Koordination von Wundheilungsprozessen.

Zentraler Bestandteil der Bindegewebematrix des Gehirns sind Proteoglykane, welche zu 90% aus Glykosaminoglykanen bestehen. Glykosaminoglykane sind Polymere aus sich wiederholendem Disaccharid, Einheiten von Glukonsäure und N-Acetylgalaktosamin/Galaktosamin. Sie determinieren die extrazelluläre Matrix und damit die physikochemischen Eigenschaften und die dreidimensionale Organisation des Hirngewebes. Sie spielen nicht nur eine entscheidende Rolle bei Zell-Zell-Kontakten, sondern auch bei Interaktionen zwischen Zellen und Substraten (Dow et Wang, 1998).

Entscheidend für die Funktion und das Zusammenwirken der einzelnen Komponenten der EZM sind Rezeptorproteine, insbesondere die Gruppen der Integrine und Dystroglykane. Sie verbinden die Bestandteile der EZM untereinander und können auch auf Signale von außen

reagieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass Integrine aktive Adhäsions-Rezeptoren für Laminine und Fibronectin sind (Milner et al., 1999). Integrine und Dystroglykane spielen damit eine entscheidende Rolle bei der Organisation und Funktion des zentralen Nervensystems (del Zoppo et Milner, 2006).

2.4.1 Veränderungen der EZM bei der AD

Es gibt zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von amyloiden Plaques und der zerebralen EZM. So konnte gezeigt werden, dass der APP-Stoffwechsel in Mikrogliazellen durch Proteine der EZM beeinflusst wird. Grundsätzlich wird angenommen, dass eine intakte EZM Neurone und Gliazellen vor einer Degeneration schützt (Bonneh-Barkay et Wiley, 2008). So fördert Fibronectin, ein Adhäsionsprotein der EZM, die Sekretion von APP und vermindert damit die intrazellulären APP-Spiegel. Umgekehrt verhält es sich mit Laminin und Kollagen, die zu einer intrazellulären Anreicherung von APP beitragen und dessen Sekretion vermindern (Mönning et al., 1995). Zudem befinden sich in den extrazellulären A β -Plaques selbst Proteoglykane, welche fibrilläres A β binden können, dessen Aggregation fördern und auf diese Weise auch dessen Proteolyse verhindern könnten (Gupta-Bansal et al., 1995). Eine weitere Interaktion findet zwischen Laminin und A β statt. Laminin scheint hierbei eine eher protektive Rolle zuzukommen (Chen et al., 2003). Hierbei verhindert Laminin scheinbar die Neuformation von Fibrillen und begünstigt darüber hinaus sogar die Depolymerisierung von bereits gebildeten Fibrillen (Morgan et Inestrosa, 2001). Ein weiteres Glykoprotein, das besonderes Augenmerk verdient, ist Reelin. Es dient der Differenzierung und Migration von Neuronen insbesondere im Hippocampus. Im Vergleich zwischen AD-Patienten und Gesunden fanden sich im Kortex von Erkrankten um 40% erhöhte Reelinkonzentrationen (Botella-Lopez et al., 2006). Zudem existiert interessanterweise eine Interaktion zwischen Reelin und dem bereits beschriebenen ApoE-Rezeptor. Hierbei dient Reelin als Signalprotein zur Initiierung von Differenzierungsprozessen im Neokortex und Kleinhirn (Herz et Chen, 2006).

Die EZM besteht aus verschiedenen anderen Proteinen, von denen vier im Folgenden einzeln besprochen werden.

2.5 Untersuchte Serumproteine

2.5.1 Albumin

Albumin besteht aus 585 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 66 kDalton. Es dient der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks im Blutplasma. Es trägt zur Pufferkapazität des Blutes bei und transportiert wasserunlösliche Substanzen im Blutkreislauf. Es wird ausschließlich in der Leber gebildet. Unter physiologischen Bedingungen verhindert die Blut-Hirn-Schranke eine Diffusion von Albumin in das Hirngewebe. Man kann Albumin sowohl im Serum als auch im Liquor bestimmen und daraus einen Quotienten bilden, welcher als Indikator die Schrankenfunktion repräsentiert. Im höheren Lebensalter erhöht sich der Quotient, was jedoch nicht zwingend mit einer klinischen Symptomatik vergesellschaftet sein muss (Pakulski, 2000). Im Vergleich von hirngesunden alten mit dementen alten Patienten jedoch zeigt sich sowohl bei der Liquorkonzentration als auch beim Albumin-Quotienten eine signifikante Erhöhung auf Seiten der Erkrankten (Wada, 1998). Es existieren allerdings auch Studien, in denen eine reziproke Beziehung zwischen Serumalbuminkonzentration und Lebensalter aufgezeigt werden konnte. Im höheren Lebensalter kommt es demnach zu einer signifikanten Erniedrigung des Albuminplasmaspiegels (Maes et al., 1999). Im Hirnparenchym konnte Albumin *post mortem* zwar nachgewiesen werden, allerdings zeigten sich im Experiment keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe. Dies führte zu der Annahme, dass das Protein erst während des Sterbeprozesses in das Hirngewebe gelangt und somit kein Indikator für vorangegangenen Transport oder intrazerebrale Genese ist (Munoz, Erkinjuntti, Gaytan-Garcia et Hachinski, 1997). *In vitro* konnte interessanterweise der Nachweis erbracht werden, dass sich aus humanem Serum-Albumin Amyloid-Fibrillen bilden können (Taboada, 2006).

2.5.2 Fibrinogen

Fibrinogen besteht aus 3 mit Disulfidbrücken untereinander verbundenen Ketten und hat ein Molekulargewicht von 340 kDalton. Es ist Vorstufe des polymerisierenden Fibrins und Co-Faktor bei der Plättchenaggregation. Es wird ausschließlich in der Leber gebildet. Die Serumkonzentration beim Gesunden liegt bei 1,5-4 mg/ml und ist unter pathologischen Bedingungen erhöht (Kamath et al., 2003). Bei Patienten mit höheren Fibrinogen-Plasmaspiegeln wurde ein erhöhtes Risiko an AD zu erkranken, festgestellt (Oijen van, 2005). Allerdings liegen nach derzeitiger Studienlage nicht nur Fibrinogen, sondern auch andere Gerinnungsfaktoren vermehrt bei AD-Patienten vor (Gupta et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Fibrinogen mit diversen Rezeptoren und Proteinen interagiert, darunter Fibronectin, das auch in der zerebralen EZM vorkommt. Die Interaktion zwischen Fibronectin und Fibrinogen reguliert die Adhäsion und Migration von Fibroblasten während der physiologischen Wundheilung (Engvall et al., 1978). Gelangt Fibrinogen jedoch aufgrund einer Blut-Hirn-Schrankenstörung in das Hirnparenchym interagiert es ebenfalls mit verschiedenen Integrin-Rezeptoren. Diese lösen daraufhin eine über Mikrogliazellen vermittelte inflammatorische Reaktion aus (Ryu and McLarnon, 2008) und können damit die Funktion der EZM entscheidend stören (Adams et al., 2004).

2.5.3 α 1-saures Glykoprotein

α 1-saures Glykoprotein gehört zur Gruppe der Akute-Phase-Proteine, hat ein Molekulargewicht von 41-43 kDalton und besteht aus 183 Aminosäuren. Es wird ausschließlich in der Leber und von einigen Tumoren gebildet. Es findet sich eine Erhöhung im Serum, wenn im Körper eine Entzündungsreaktion stattfindet. Seine eigentliche biologische Funktion konnte bisher nicht geklärt werden. Es wurden jedoch verschiedene Bindungsstellen identifiziert, darunter auch Rezeptoren für Steroide und Phenobarbital (Fournier et al., 2000). Interessanterweise bindet α 1-saures Glykoprotein auch an von nicht-hepatischen Tumorzellen gebildetes Laminin. Es scheint so Tumorproliferation und Metastasierung zu hemmen (Lee et al., 2001). Eine Erhöhung der Konzentration von α 1-saurem Glykoprotein im Serum konnte bei einer Vielzahl von meist mit einer Inflammation einhergehenden Erkrankungen nachgewiesen werden. Hierzu gehören vor allem chronisch-entzündliche Prozesse wie Morbus Crohn, Atherosklerose und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Schultz et Arnold, 1990).

2.5.4 α 1-anti-Chymotrypsin

α 1-anti-Chymotrypsin ist ein Serin-Protease-Inhibitor und gehört zu den Akute-Phase-Proteinen. Es ist eines der bisher im Bezug auf die AD am intensivsten beforschten Serumproteine. Es ist integraler Bestandteil der A β -Plaques (Abraham, Selkoe et Potter, 1988) und wurde vermehrt in deren Umgebung vorgefunden (Pasternack, 1989). Das im humanen Hippocampus registrierte aaC ist jedoch nur zu 90% identisch mit dem in der Leber gebildeten aaC (Hwang, Steineckert, Kohn et al., 1999). Es wird diskutiert, ob es sich beim mit AD assoziierten aaC um ein auch physiologisch vorkommendes Protein oder um eine mutierte Variante handelt (Wang, 2002). *In vitro* und im Mausmodell katalysiert aaC die Polymerisation von β -Amyloid-Peptiden (Nilsson et al, 2001) und hat die Fähigkeit diese zu binden (Wang et al., 2002). Ein weiterer Mechanismus ist die Fähigkeit von aaC die Phosphorylierung des tau-Proteins in Neuronen zu induzieren (Padmanabhan, 2006) und damit indirekt die Entstehung von A β -Plaques zu begünstigen. Sowohl im Liquor (Harigaya, 1995) als auch im Plasma (Dik et al., 2005) von AD-Patienten wurden erhöhte aaC-Spiegel nachgewiesen. In einer weiteren prospektiven Studie konnte sogar belegt werden, dass bei klinisch gesunden Probanden das Demenzrisiko mit dem aaC-Plasmaspiegel korreliert (Engelhart et al., 2004).

Der Zusammenhang zwischen α 1-anti-Chymotrypsin und der AD bietet einen großen Spielraum für mögliche Interaktionsmechanismen.

2.6 Fragestellung

Viele der diskutierten Mechanismen können alleine nicht erklären, wie es zu der dramatischen neuronalen Degeneration bei der AD im menschlichen Gehirn kommt. Einzig die Plaqueablagerung, die auch beim alternden Menschen stattfindet, steht seit Erstbeschreibung der Krankheit im Mittelpunkt der Diskussion. Nach wie vor konnte jedoch nicht befriedigend geklärt werden, ob und wie sich Neurone und deren Umgebung im Verlauf der Erkrankung verändern. So ist es möglich, dass Alterungsprozesse im Gehirn, z.B. durch Veränderung der Proteinzusammensetzung in der Gewebematrix deren physikochemische Eigenschaften beeinflussen. So könnte eine gestörte Matrix die Neigung des bereits auf physiologische Weise synthetisierten Amyloidpeptids zur Aggregation fördern und somit zur Alzheimer Pathologie führen.

Es gibt Hinweise dafür, dass Glukosaminoglykane in der Pathophysiologie der AD eine prädisponierende Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Akute-Phase-Proteine an den Plaques vorkommen und *in vitro* zur Aggregation und Plaquebildung beitragen. Ob Akute-Phase-Proteine, die sich unspezifisch aus der Blutbahn in der Hirngewebematrix, Neuronen und Gliazellen ansammeln, hierbei eine Rolle spielen, ist noch nie untersucht worden. In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen experimentell bearbeitet werden:

1. Lassen sich Serumproteine (die nach heutigem Kenntnisstand ausschließlich peripher synthetisiert werden) in unterschiedlicher Stärke im Hirngewebe des alternden Menschen sowie beim Patienten mit Alzheimer Krankheit nachweisen?
2. Gibt es Unterschiede in der Verteilung der Serumproteine in Bezug auf deren Vorkommen, Anzahl und Lokalisation in kortikalem und hippocampalen Hirngewebeschnitten?
3. Sind Akute-Phase-Proteine zerebralen Ursprungs im Hirngewebe von gesunden Patienten der Altersgruppe < 65 Jahre im Vergleich zu älteren Individuen in unterschiedlicher Stärke vorhanden?

3 Material & Methoden

3.1 Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche humane Hirngewebe immunhistochemisch untersucht. Es wurden von jedem Patienten jeweils Schnitte durch den Hippocampus und durch die occipitale Kortexregion angefertigt. Dabei konnten die Patienten in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe (n=10) bilden *post mortem* entnommene Hirngewebe von an einer Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten (Alter: 60-86 Jahre, Altersdurchschnitt: 76,1 Jahre). Die zweite Gruppe (n=10) besteht aus Gewebe von Patienten, die im höheren Lebensalter verstorben sind, aber nicht unter einer AD litten (Alter: 72-93 Jahre, Altersdurchschnitt: 82,9 Jahre). Die Gewebeproben stammen aus dem Neuropathologischen Institut der Universitätsklinik Homburg unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Feiden. Die dritte Gruppe (n=9) wurde *post mortem* jungen Patienten entnommen, die ebenfalls nicht an einer AD erkrankt waren (Alter: 35-65 Jahre, Altersdurchschnitt: 51,2 Jahre). Diese Proben wurden vom Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Leitung von Prof. Dr. Markus Glatzel zur Verfügung gestellt.

3.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus, kelvitron t, Hanau
Eppendorf Varipette	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage ALS 120	Kern, Balingen
Heizblock OTS 40	Mediton
Kamera DXM 1200	Nikon, Düsseldorf
Kühlplatte B 3120060 Cold Plate	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Magnetrührer MR 2000	Heidolph, Kelheim
Mikroskop Eclipse E 600	Nikon, Düsseldorf
Mikrotom SM 2000 R	Leica, Solms
Mikrowelle R-204	Sharp, Hamburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg

pH-Meßgerät Inolab pH Level 1

WTW, Weilheim

Vortex Vortexgenie 2

Scientific Industries, New York, USA

Wasserbad WB 24

Medax, Nagel, Kiel

3.3 Antikörper

Es wurden kommerziell erworbene Antikörper verwendet (Tab. 1).

Antikörper	Antigen	Isotyp	Quelle
Rabbit-anti-human	Albumin	IgG	DAKO
Rabbit-anti-human	Fibrinogen	IgG	DAKO
Rabbit-anti-human	α 1-anti-Chymotrypsin	IgG	DAKO
Goat-anti-human	α 1-saures Glykoprotein	IgG	AGP
Mouse-anti-human	A β	IgG	DAKO
Goat-anti-mouse	Zweitantikörper	IgG	DAKO
Goat-anti-rabbit	Zweitantikörper	IgG	Vector
Rabbit-anti-goat	Zweitantikörper	IgG	Vector
Goat-anti-rabbit	Zweitantikörper	IgG	Vector

Tab. 1: Aufstellung der eingesetzten Antikörper: Antigene, Isotypen, sowie Bezugsquellen

3.4 Präparation des Gewebes

Die verwendeten humanen Gewebe wurden *post mortem* aus Hippocampus und occipitalem Kortex entnommen und in Paraffinblöcke eingebettet. Die entstandenen Blöcke wurden auf einer Kühlplatte auf -11 Grad Celsius herunter gekühlt. Daraufhin wurden per Mikrotom $2\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte des Gewebes angefertigt und auf zuvor silanisierten Objektträgern fixiert. Jeder Objektträger wurde nach einem festen Schema silanisiert. Hierzu wurde Aceton mit 2%igem Silan (Fluka) versetzt und die Objektträger für 5 Minuten in der Lösung belassen. Danach wurden sie dreimal 5 Minuten lang in reinem Aceton gewaschen, beschriftet und anschließend getrocknet.

3.5 Immunhistologische Analysen

3.5.1 DAB

25 mg DAB-Pulver (Sigma) wurden in 50 ml PBS gelöst. Nach Zugabe von $20\ \mu\text{l}$ H_2O_2 (Eigenproduktion) wurden die Objektträger unter Mikroskopkontrolle für ca. 90 Sekunden gefärbt.

3.5.2 Neufuchsin

Zuerst wurden drei verschiedene Lösungen hergestellt. Die erste Lösung bestand aus 10 mg Natriumnitrit (Merck), $250\ \mu\text{l}$ H_2O_2 und $100\ \mu\text{l}$ 5%iger Neufuchsinlösung (Sigma). Die zweite Lösung beinhaltete 14 mg As-Bi-phosphat (Sigma) gelöst in $300\ \mu\text{l}$ N-N-Dimethylformamid. Die dritte Lösung bestand aus 25 mg Levamisol (MP), das in 50 ml TBS aufgelöst wurde. Die zweite und die erste Lösung wurden nacheinander in die dritte Lösung gegeben und mit dieser vermischt. Danach wird der pH-Wert mit Hilfe eines pH-Meters durch Zugabe von NaOH 1N (Roth) auf 8,8 eingestellt und die Lösung filtriert.

3.6 Färbung mit Albumin, Fibrinogen, α 1-anti-Chymotrypsin und α 1-saures-Glykoprotein

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur (RT) in absteigender Alkoholreihe deparaffiniert und danach kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Im zweiten Schritt folgte eine Vorbehandlung mit Citratpuffer. Dabei wurden die Schnitte 5mal für 3 Minuten bei 560 Watt in der Mikrowelle gekocht und danach in entmineralisiertem Wasser abgekühlt. Die Schnitte wurden nun für eine Minute in 100%ige Ameisensäure (Merck) gegeben und danach 3mal kurz in TBS gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer (Eigenbau) überführt und für 20 Minuten zur Freilegung der Antikörperbindungsstellen mit 3%igem H_2O_2 in PBS inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift in TBS blockierte man die Schnitte, auf denen Fibrinogen, α 1-saure-Glykoprotein und α 1-anti-Chymotrypsin gefärbt werden sollten für 30 Minuten mit Casein 0,2%. Bei der Anfärbung von Albumin wurde mit 5%igem Ziegen Serum (Sigma) in PBS eine Stunde lang blockiert. Anschließend wurde nicht gewaschen, sondern das überschüssige Casein bzw. Ziegen Serum auf Zellstoff abgekippt. Nun folgte die 90-minütige Inkubation mit dem Erstantikörper. Für die Färbung von Fibrinogen, α 1-saures-Glykoprotein und α 1-anti-Chymotrypsin wurde der Primärantikörper in 0,02%igen Casein in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 1:200 gelöst. Die Inkubation mit dem Erstantikörper gegen Albumin erfolgte in 1%igen Ziegen Serum in PBS in einer Konzentration von 1:200. Nachfolgend wurden die Objektträger zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper 3mal in TBS und einmal in TBS-T gewaschen. Der Zweitantikörper, ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Vector) wurde ebenfalls in 0,02%igem Casein bzw. im Falle des Albumins PBS in einem Mischungsverhältnis von 1 zu 200 gelöst und die Schnitte damit eine Stunde lang inkubiert. Für das α 1-saure-Glykoprotein wurde als Sekundärantikörper ein biotinylierter Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper (Vector) verwendet. Daraufhin wurden alle Objektträger erneut dreimalig kurz in TBS gewaschen. Im Anschluss wurde Streptavidin-Peroxidase (Vectastain ABC Kit, DAKO) für 30 Minuten bei RT zugegeben, woraufhin wieder ein Waschschrift folgte. Entwickelt wurde mit DAB (Sigma), wobei der Entwicklungsstand mikroskopisch überprüft wurde. Im letzten Schritt wurde dann mit Hematoxylin (Merck) für 20 Sekunden gegengefärbt, die Farbe mit Leitungswasser entwickelt und die Präparate mit Aquatex (Merck) wässrig eingedeckelt.

3.7 Co-Färbung mit A β

Zur Darstellung der Amyloid-Plaques wurde im ersten Inkubationsschritt gemeinsam mit dem Primärantikörper ein Antikörper gegen A β im Verhältnis 1 zu 100 beigefügt. In der Co-Färbung aller vier Proteine wurde ein Maus-anti-Mensch-Antikörper (DAKO) verwendet. Für Albumin, Fibrinogen und α 1-anti-Chymotrypsin wurde im zweiten Inkubationsschritt ein AP-gelabelter Ziege-anti-Maus-Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 1 zu 200 verwendet. Für das α 1-saure-Glykoprotein wurde bei der zweiten Inkubation ein AP-gelabelter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (DAKO) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 1 zu 200 verwendet. Danach wurde mit Neufuchsin entwickelt, wobei der Entwicklungsstand mikroskopisch überprüft wurde.

3.8 Mikroskopische Auswertung

Unter dem Mikroskop wurden die immunohistochemisch gefärbten Hirnschnitte hinsichtlich des Vorliegens von positiv markierten Zellen, extrazellulären Infiltraten und Gefäßinhalten untersucht. Hierbei wurde Vorliegen, Anzahl und Verteilung deskriptiv analysiert. Die Anzahl der positiv angefärbten Zellen wurde semiquantitativ bestimmt. Die Gewebeschnitte wurden hierzu an verschiedenen Lokalisationen unter dem Mikroskop bei 10facher Vergrößerung nach einem festgelegten Schema (Tab. 2) beurteilt. Dabei wurde folgende Einteilung verwendet:

Ergebnis	Beschreibung	Positive Zellen pro Gesichtsfeld
0	Keine bis sehr wenige positive Zellen	0-1/Gesichtsfeld
1	Wenige positive Zellen	1-2/Gesichtsfeld
2	Einige positive Zellen	2-3/Gesichtsfeld
3	Viele positive Zellen	3-4/Gesichtsfeld
4	Sehr viele positive Zellen	>4/Gesichtsfeld

Tab. 2: schematische Einteilung der Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld

Für alle vier untersuchten Proteine wurden die Gewebeschnitte auf Auffälligkeiten bei der Verteilung mikroskopisch untersucht. Als Kriterien wurden perivaskuläre Lokalisation, eventuelle Plaquesassoziation und Anzahl vorhandener Plaques gewählt.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistik-Programm SPSS durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-Test für nicht-parametrische Stichproben errechnet. Hierbei gingen die absoluten Einzelwerte jedes Experimentes in die Berechnung ein.

4 Ergebnisse

4.1 Semiquantitative Analyse der Expression von Plasmaproteinen bei AD-Patienten im Vergleich zum >65-jährigen und <65-jährigen hirngesunden Menschen

4.1.1 Immunhistochemische Analyse von α 1-anti-Chymotrypsin

α 1-anti-Chymotrypsin ist ein Serin-Protease-Inhibitor, zu dem es Hinweise auf eine Mitbeteiligung bei der Formation von A β -Plaques gibt.

Aufgrunddessen sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Verteilung α 1-anti-Chymotrypsin-positiver Zellen im Hirn von AD-Patienten (AD) versus hirngesunden gleichaltrigen Kontrollen (> 65) und von alten Kontrollen vs jungen Kontrollen (< 65) gibt. Es wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt, die semiquantitativ analysiert wurden. Im Ergebnis zeigte sich, dass α 1-anti-Chymotrypsin in Neuronen und Gliazellen identifiziert werden konnte. Es ergab sich eine signifikant stärkere Anfärbung im Gehirn von AD-Patienten im Vergleich zu gleichaltrigen hirngesunden Menschen oder im Vergleich zu hirngesunden jungen Menschen.

Hierbei konnten im Hippocampus (Abb. 6 und 8) auf Seiten der AD-Patienten (Abb. 12 a und b) im Mittel $3,5 \pm 0,53$ gegenüber $2,8 \pm 0,42$ positive Gliazellen identifiziert werden ($p=0,007$). Kortikal (Abb. 5 und 7) wurden bei AD-Patienten (Abb. 9 a und b) im Mittel $3,7 \pm 0,48$ Gliazellen mit positivem α 1-anti-Chymotrypsin nachgewiesen. Im Vergleich hierzu ergab sich im Kortex für die Altersgruppe > 65 Jahre (Abb. 10 a und b) ein Mittelwert von $3,2 \pm 0,42$ positiven Gliazellen ($p=0,028$). Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung von α 1-anti-Chymotrypsin-positiven Neuronen ergab sich auch im Kortex. Auf der verwendeten Skala lagen positive Neurone von an Alzheimer leidenden Patienten bei einem Wert von $3,2 \pm 0,42$, während Neurone von gesunden Individuen der Altersgruppe > 65 Jahre einen Wert von $2,6 \pm 0,52$ erreichten ($p=0,015$). Die Gruppe der hirngesunden > 65-jährigen Menschen (Abb. 13 a und b) zeigte im Vergleich zur Gruppe der an AD leidenden Patienten in hippocampalen Neuronen (AD: $3,7 \pm 0,48$ Vs. > 65: $3,3 \pm 0,82$, $p=0,259$) keinen signifikanten Unterschied für α 1-anti-Chymotrypsin.

Die Auswertung für hirngesunde Patienten < 65 Jahre im Vergleich zu AD-Patienten ergab ebenfalls signifikante Unterschiede. So lag die Anzahl von α 1-anti-Chymotrypsin-positiven Neuronen im Kortex (Abb. 11 a und b) auf der verwendeten Skala bei erkrankten Individuen bei $3,2 \pm 0,42$ im Vergleich zu $2,2 \pm 0,53$ beim jungen gesunden Patienten ($p=0,019$). Für kortikale Gliazellen (AD: $3,7 \pm 0,48$ Vs. < 65: $3,22 \pm 0,83$, $p=0,18$) und hippocampale Neurone (AD: $3,7 \pm 0,48$ Vs. < 65: $3,44 \pm 0,73$, $p=0,44$) bzw. Gliazellen (AD: $3,5 \pm 0,53$ Vs. < 65: $3,1 \pm 0,93$, $p=0,37$) fanden sich keinerlei signifikanten Verteilungsunterschiede für α 1-anti-Chymotrypsin zwischen < 65-jährigen Menschen (Abb. 14 und b) und an AD erkrankten Individuen.

Beim Vergleich der beiden hirngesunden Patientengruppen (Tab. 3) ergaben sich weder im Kortex noch im Hippocampus Unterschiede in der Verteilung α 1-anti-Chymotrypsin-positiver Neurone oder Gliazellen.

	Glia kortikal	Glia hippocampal	Neurone kortikal	Neurone hippocampal
> 65	$3,2 \pm 0,42$	$2,8 \pm 0,42$	$2,6 \pm 0,52$	$3,3 \pm 0,82$
< 65	$3,22 \pm 0,83$	$3,11 \pm 0,93$	$2,66 \pm 1$	$3,44 \pm 0,73$
P	0,58	0,362	0,86	0,72

Tab.3, **α 1-anti-Chymotrypsin**: Im Vergleich zwischen hirngesunden >65-jährigen und <65-jährigen zeigten sich keine signifikanten Verteilungsunterschiede.

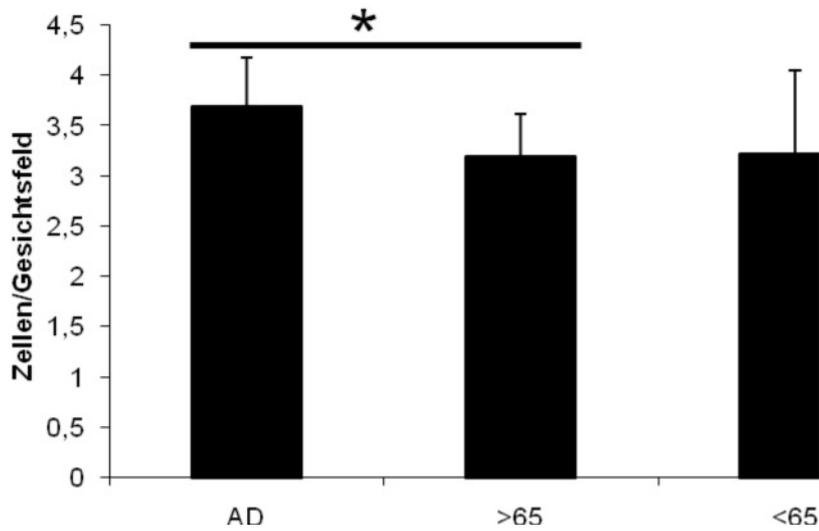


Abb. 5, **Kortex**: Verteilung alpha-1-Chymotrypsin-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen mit signifikantem Verteilungsunterschied zwischen AD-Patienten und >65-jährigen Individuen zugunsten der Erkrankten.

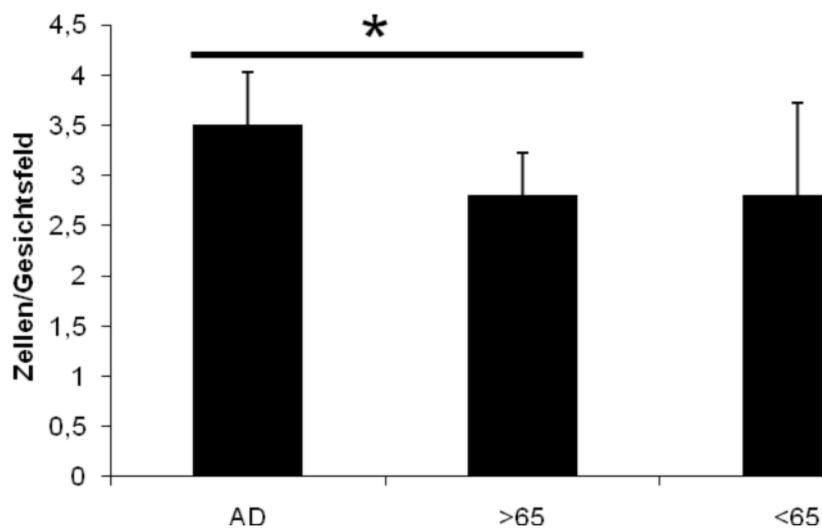


Abb. 6, **Hippocampus**: Verteilung alpha-1-Chymotrypsin-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen mit signifikantem Verteilungsunterschied zwischen AD-Patienten und >65-jährigen Individuen zugunsten der Erkrankten.

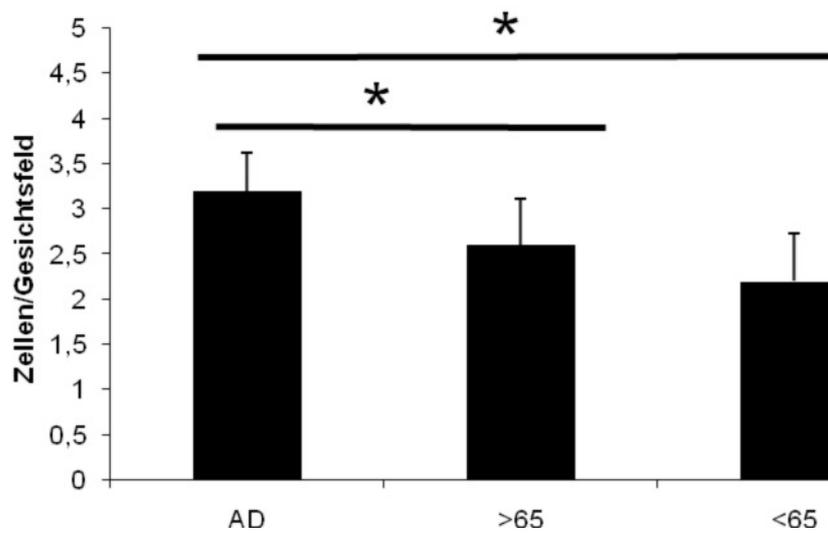


Abb. 7, **Kortex**: Verteilung alpha-1-Chymotrypsin-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen mit signifikantem Verteilungsunterschied zwischen AD-Patienten und >65-jährigen und <65-jährigen Individuen zugunsten der Erkrankten.

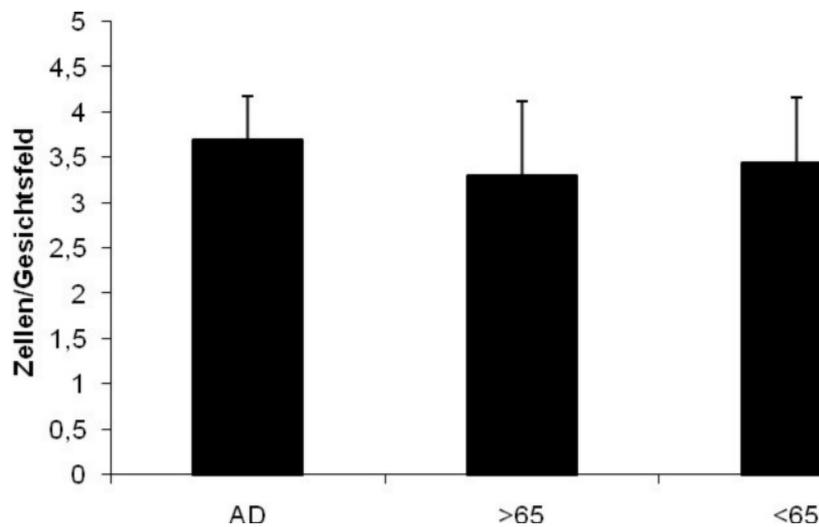


Abb. 8, **Hippocampus**: Verteilung alpha-1-Chymotrypsin-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

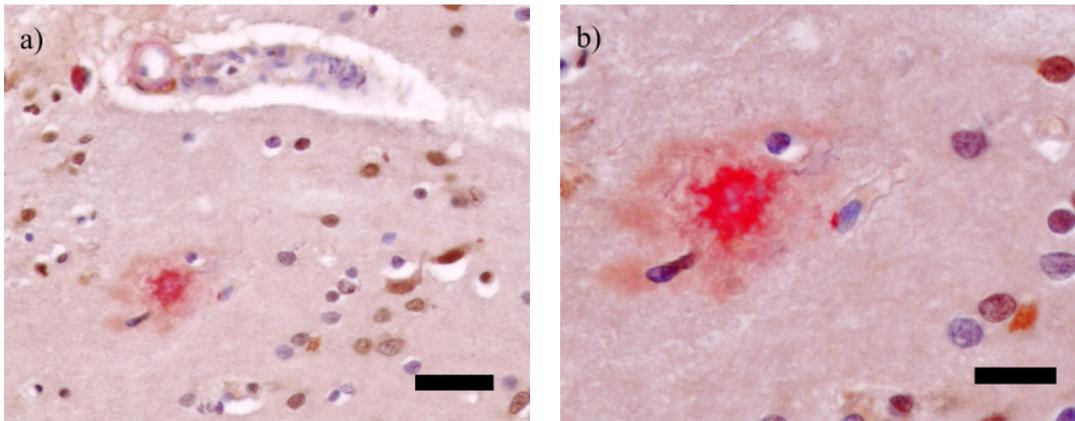


Abb. 9 a) und b): **Kortex** eines an AD-erkrankten Patienten mit alpha-1-Chymotrypsin-positiven Neuronen , Gliazellen und Abeta-Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-Chymotrypsin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt. In der semiquantitativen Analyse zeigte sich ein signifikanter Verteilungsunterschied zugunsten der an AD erkrankten Patientengruppe.

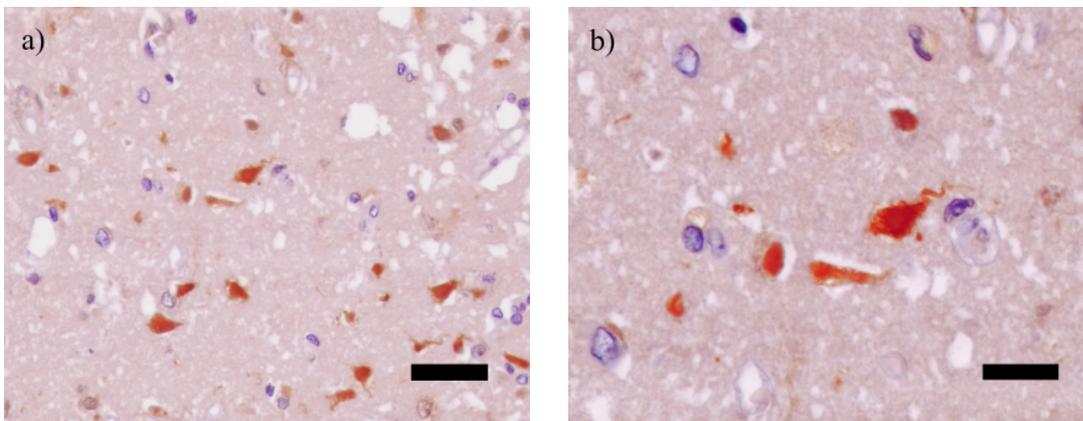


Abb. 10 a) und b): **Kortex** eines hirngesunden >65-jährigen Patienten mit alpha-1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-Chymotrypsin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

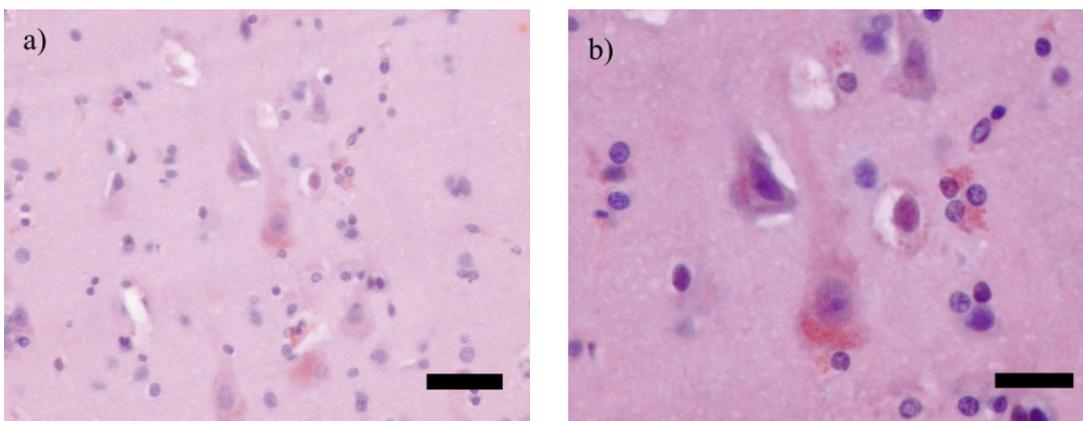


Abb. 11 a) und b): **Kortex** eines hirngesunden <65-jährigen Patienten mit alpha-1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-Chymotrypsin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

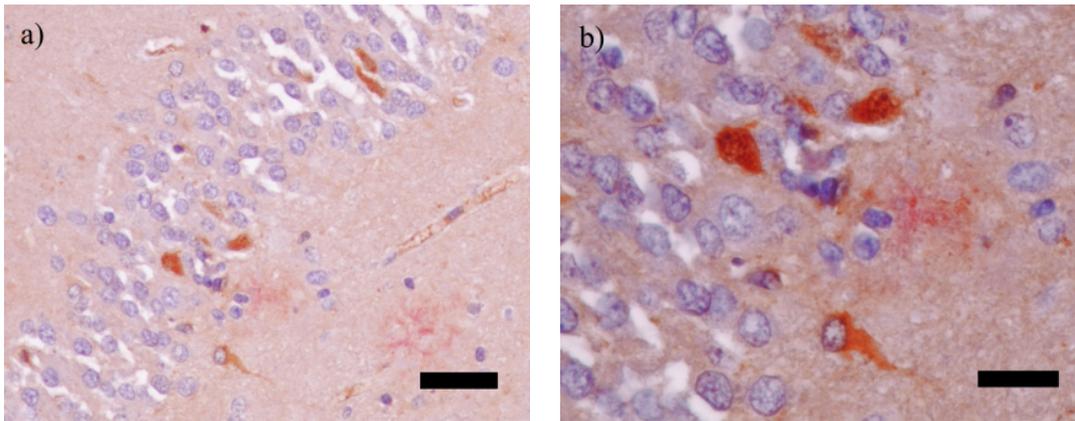


Abb. 12 a) und b): **Hippocampus** eines an AD-erkrankten Patienten mit alpha-1-Chymotrypsin-positiven Neuronen, Gliazellen und Abeta-Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-Chymotrypsin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt. In der semiquantitativen Analyse zeigte sich ein signifikanter Verteilungsunterschied zugunsten der an AD erkrankten Patientengruppe.

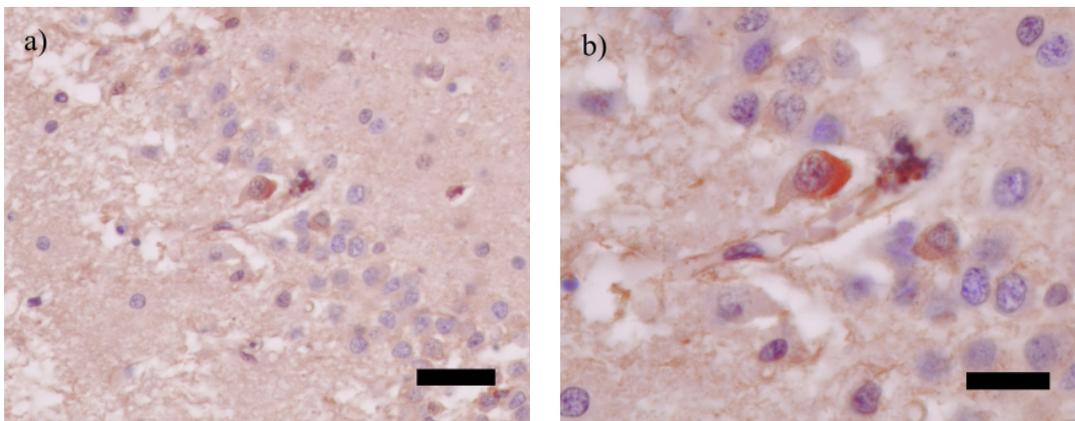


Abb. 13 a) und b): **Hippocampus** eines hirngesunden >65-jährigen Patienten mit alpha-1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-Chymotrypsin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

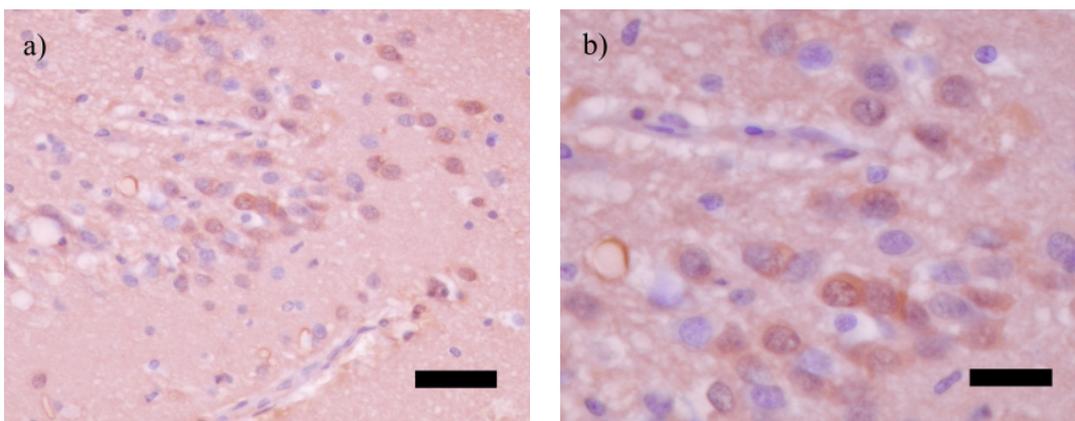


Abb. 14 a) und b): **Hippocampus** eines hirngesunden <65-jährigen Patienten mit alpha-1-Chymotrypsin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-Chymotrypsin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

4.1.2 Immunhistochemische Analyse von Albumin

Albumin ist ein Plasmaprotein, dessen Fähigkeit zur Ausbildung von Amyloid-Fibrillen *in vitro* nachgewiesen werden konnte. Außerdem dient Albumin als Marker zur Bestimmung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke.

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Korrelation zwischen Albumin und der Alzheimerpathologie bzw. physiologischen Altersvorgängen herausgearbeitet werden. Es wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt, die semiquantitativ ausgewertet wurden. Im Ergebnis zeigte sich, dass Albumin in Neuronen und Gliazellen identifiziert werden konnte. Der Vergleich zwischen Hirngewebe von AD-Patienten und hirngesunden > 65-jährigen Individuen (Abb. 20 und 23 a und b) zeigte einen signifikanten Verteilungsunterschied. Auf der verwendeten Skala lag der Wert für Albumin-positive Neurone im Kortex (Abb. 17) im Mittel bei $2,3 \pm 0,48$ pro AD-Patient gegenüber $1,4 \pm 0,52$ pro hirngesunde altersentsprechende Kontrolle ($p=0,002$). Für hippocampale Neurone (AD: $3,3 \pm 0,67$ Vs. > 65: $3,3 \pm 0,82$, $p=0,90$) und Gliazellen (AD: $2,6 \pm 0,52$ Vs. > 65: $2,2 \pm 0,63$, $p=0,15$) sowie für kortikale Gliazellen (AD: $2,6 \pm 0,52$ Vs. $2,1 \pm 0,99$, $p=0,15$) ergaben sich beim Vergleich von Alzheimer-Patienten und normal gealterten Individuen bezüglich der Anzahl Albumin-positiver Zellen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18).

Im Vergleich der Alzheimer Gehirne mit hirngesunden Kontrollen < 65 Jahre (Abb. 21 a und b) zeigten sich sowohl für hippocampale als auch für kortikale Gliazellen signifikante Unterschiede in der Albuminverteilung (Abb. 15 und 16). Im Hippocampus (Abb. 22 a und b) lag die Anzahl Albumin-positiver Gliazellen im Gewebe von AD-Patienten bei $2,6 \pm 0,52$ während sich für die jungen Patienten (Abb. 24 a und b) ein Mittelwert von $1,89 \pm 0,33$ ergab ($p=0,012$). Für kortikale Gliazellen von AD-Patienten (Abb. 19 a und b) lag die Anzahl positiver Zellen bei an AD erkrankten Patienten bei $2,6 \pm 0,52$ im Vergleich zu $1,89 \pm 0,33$ bei Individuen aus der Altersgruppe < 65 Jahre ($p=0,005$). Weder für hippocampale (AD: $3,3 \pm 0,67$ Vs. < 65: $3,11 \pm 0,60$, $p=0,52$) noch für kortikale Neurone (AD: $2,3 \pm 0,48$ Vs. < 65: $1,77 \pm 0,83$, $p=0,35$) ergaben sich signifikante Unterschiede in der Verteilung von Zellen mit nachgewiesener Albumin-Positivität.

Beim Vergleich der beiden hirngesunden Patientengruppen (Tab. 4) ergaben sich weder im Kortex noch im Hippocampus Unterschiede in der Verteilung Albumin-positiver Neurone oder Gliazellen.

	Glia kortikal	Glia hippocampal	Neurone kortikal	Neurone hippocampal
> 65	2,1 ± 0,99	2,2 ± 0,63	1,4 ± 0,52	3,3 ± 0,82
< 65	1,88 ± 0,33	1,88 ± 0,33	1,77 ± 0,83	3,11 ± 0,60
P	0,43	0,051	0,15	0,21

Tab.4, **Albumin**: Im Vergleich zwischen hirngesunden >65-jährigen und <65-jährigen zeigten sich keine signifikanten Verteilungsunterschiede.

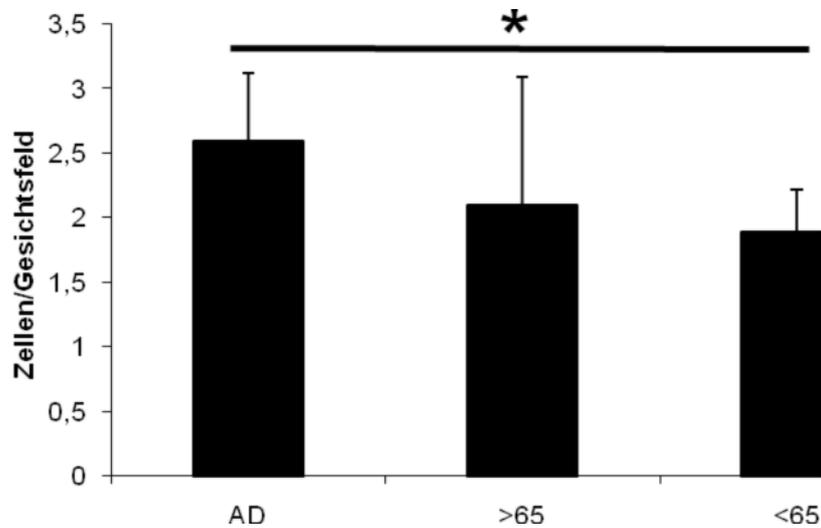


Abb. 15, **Kortex**: Verteilung Albumin-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen mit signifikantem Verteilungsunterschied zwischen AD-Patienten und <65-jährigen Individuen zugunsten der Erkrankten.

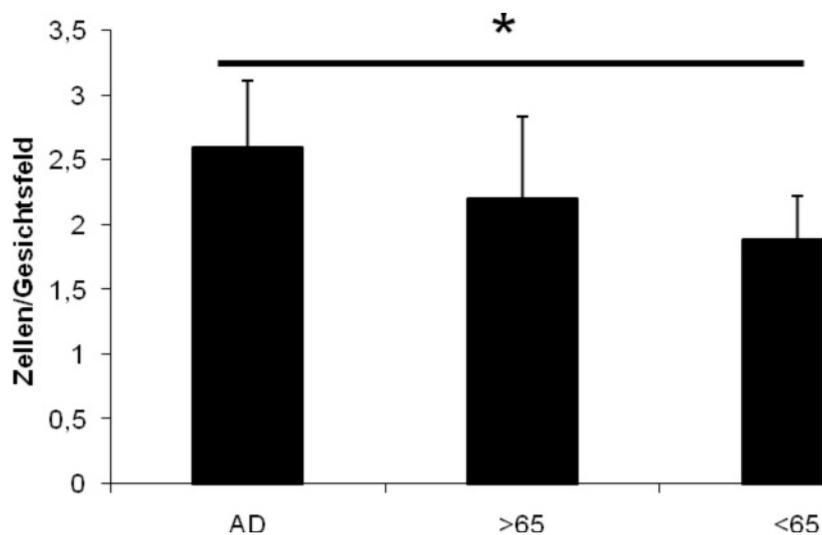


Abb. 16, **Hippocampus**: Verteilung Albumin-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen mit signifikantem Verteilungsunterschied zwischen AD-Patienten und <65-jährigen Individuen zugunsten der Erkrankten.

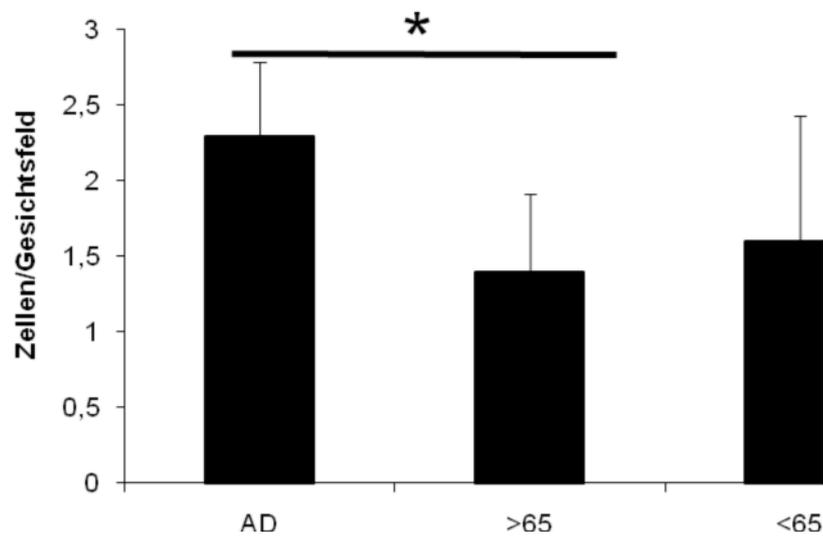


Abb. 17, **Kortex**: Verteilung Albumin-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen mit signifikantem Verteilungsunterschied zwischen AD-Patienten und >65-jährigen Individuen zugunsten der Erkrankten.

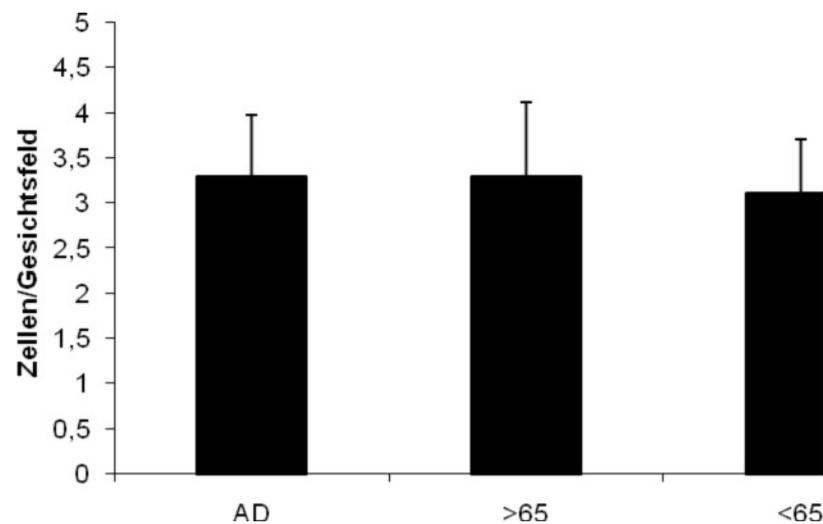


Abb. 18, **Hippocampus**: Verteilung Albumin-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

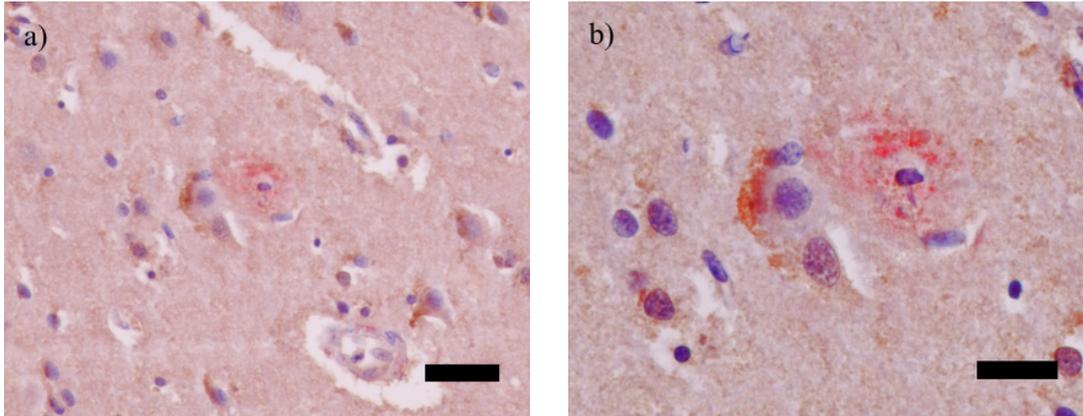


Abb. 19 a) und b): **Kortex** eines an AD-erkrankten Patienten mit Albumin-positiven Neuronen, Gliazellen und Abeta-Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. Albumin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt. In der semiquantitativen Analyse zeigte sich ein signifikanter Verteilungsunterschied zugunsten der an AD erkrankten Patientengruppe.

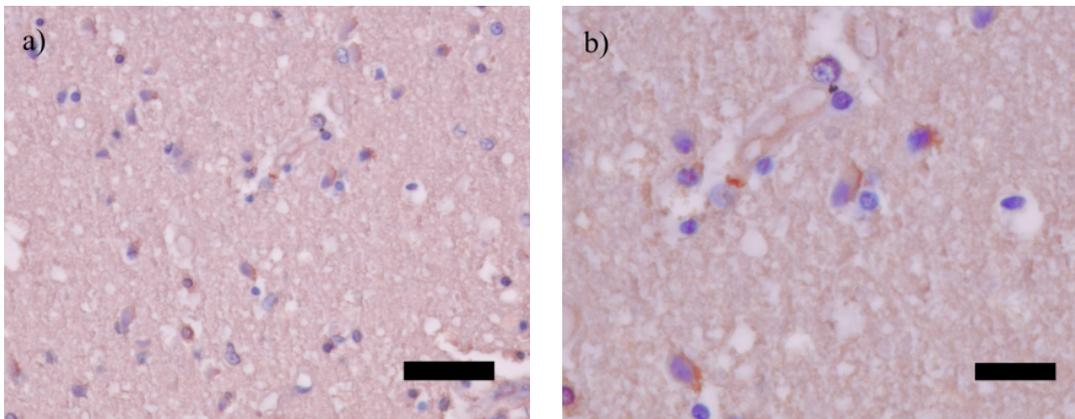


Abb. 20 a) und b): **Kortex** eines hirngesunden >65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. Albumin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

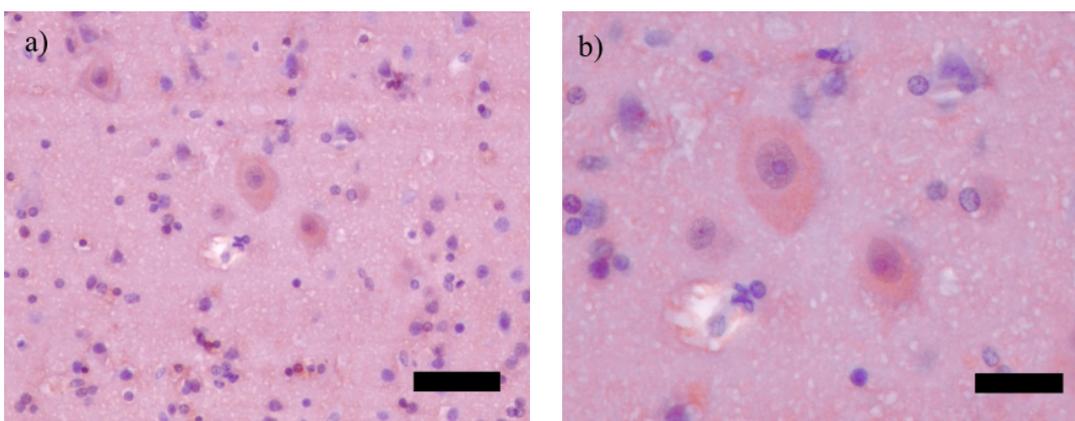


Abb. 21 a) und b): **Kortex** eines hirngesunden <65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. Albumin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

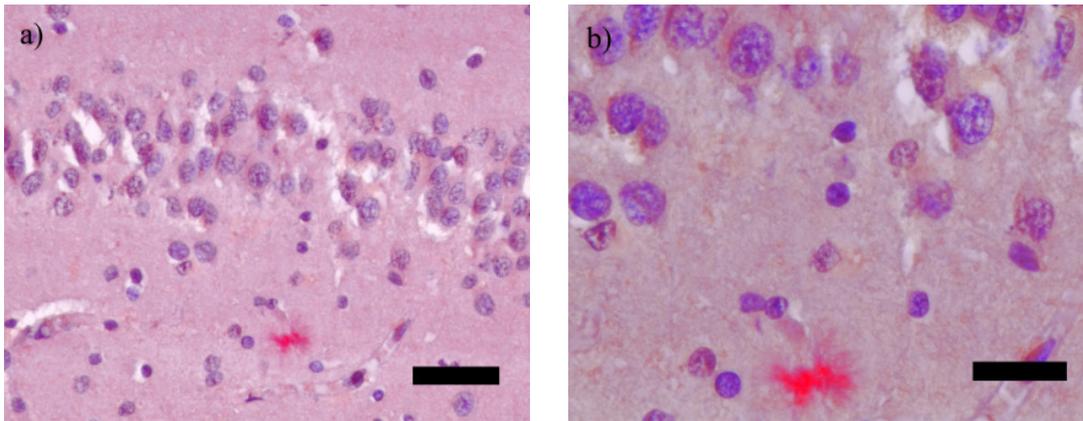


Abb. 22 a) und b): **Hippocampus** eines an AD-erkrankten Patienten mit Albumin-positiven Neuronen , Gliazellen und Abeta-Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. Albumin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt. In der semiquantitativen Analyse zeigte sich ein signifikanter Verteilungsunterschied zugunsten der an AD erkrankten Patientengruppe.

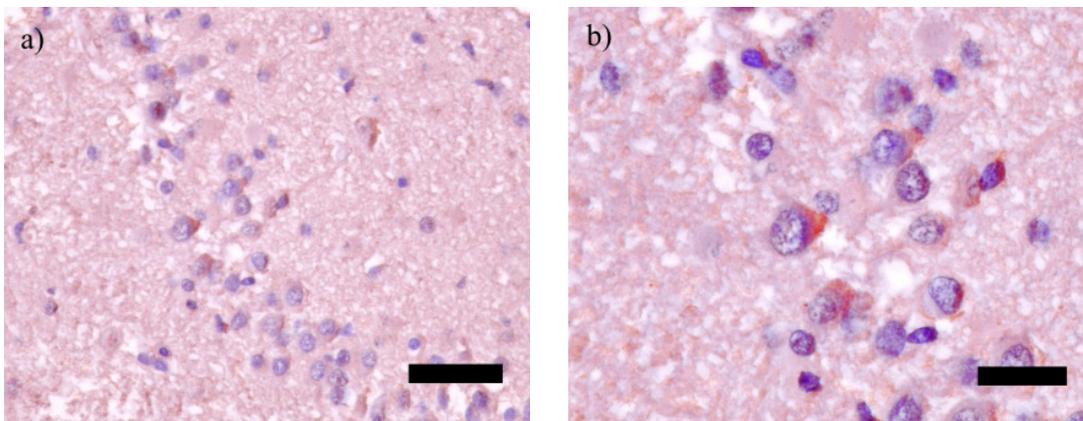


Abb. 23 a) und b): **Hippocampus** eines hirngesunden >65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. Albumin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

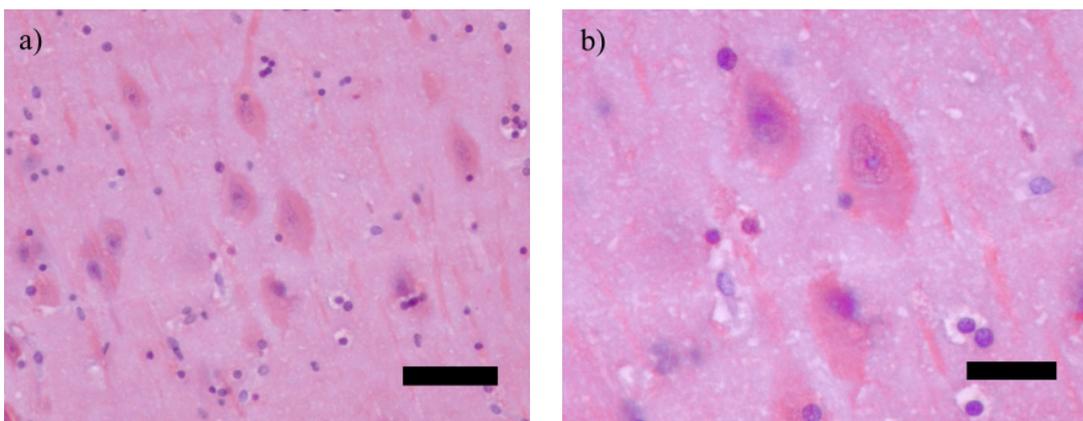


Abb. 24 a) und b): **Hippocampus** eines hirngesunden <65-jährigen Patienten mit Albumin-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. Albumin wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

4.1.3 Immunhistochemische Analyse von Fibrinogen

Fibrinogen ist ein Protein, das bei der Blutgerinnung mit Hilfe von Thrombin in seine aktive Form Fibrin umgewandelt wird. Ein erhöhter Fibrinogenwert im Plasma findet sich bei verschiedenen pathologischen Zuständen. Wie Albumin werden Fibrinogenspiegel als Referenzwert für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke genutzt.

Aufgrunddessen sollte untersucht werden, ob es Unterschiede in der Verteilung Fibrinogen-positiver Zellen im Gehirn von AD-Patienten versus hirngesunden gleichaltrigen Kontrollen und von alten Kontrollen vs. jungen Kontrollen gibt. Es wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt, die semiquantitativ analysiert wurden. Im Ergebnis zeigte sich, dass Fibrinogen in Neuronen und Gliazellen identifiziert werden konnte. In der Analyse zeigten sich innerhalb der drei Vergleichsgruppen (AD-Patienten, Individuen > 65 Jahre und < 65 Jahre) auf der verwendeten Skala keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung Fibrinogen-positiver Neurone und Gliazellen (Tab. 5, 6 und 7, Abb. 25, 26, 27 und 28).

	Glia kortikal	Glia hippocampal	Neurone kortikal	Neurone hippocampal
AD	2,2 ± 1,03	2,3 ± 0,67	1,2 ± 0,42	1,7 ± 1,16
> 65	1,9 ± 0,57	2,3 ± 1,16	1,3 ± 0,67	2,4 ± 1,17
p	0,66	0,87	0,59	0,20

Tab.5, **Fibrinogen**: Im Vergleich zwischen AD-Patienten und hirngesunden >65-jährigen zeigten sich keine signifikanten Verteilungsunterschiede.

	Glia kortikal	Glia hippocampal	Neurone kortikal	Neurone hippocampal
AD	2,2 ± 1,03	2,3 ± 0,67	1,2 ± 0,42	1,7 ± 1,16
< 65	2,44 ± 1,01	2,44 ± 1,01	1,77 ± 0,97	2,44 ± 0,88
p	0,52	0,66	0,16	0,11

Tab.6, **Fibrinogen**: Im Vergleich zwischen AD-Patienten und hirngesunden <65-jährigen zeigten sich keine signifikanten Verteilungsunterschiede.

	Glia kortikal	Glia hippocampal	Neurone kortikal	Neurone hippocampal
> 65	1,9 ± 0,57	2,3 ± 1,16	1,3 ± 0,67	2,4 ± 1,17
< 65	2,44 ± 1,01	2,44 ± 1,01	1,77 ± 0,97	2,44 ± 0,88
p	0,22	0,97	0,35	0,93

Tab.7, **Fibrinogen**: Im Vergleich zwischen hirngesunden >65-jährigen und <65-jährigen zeigten sich keine signifikanten Verteilungsunterschiede.

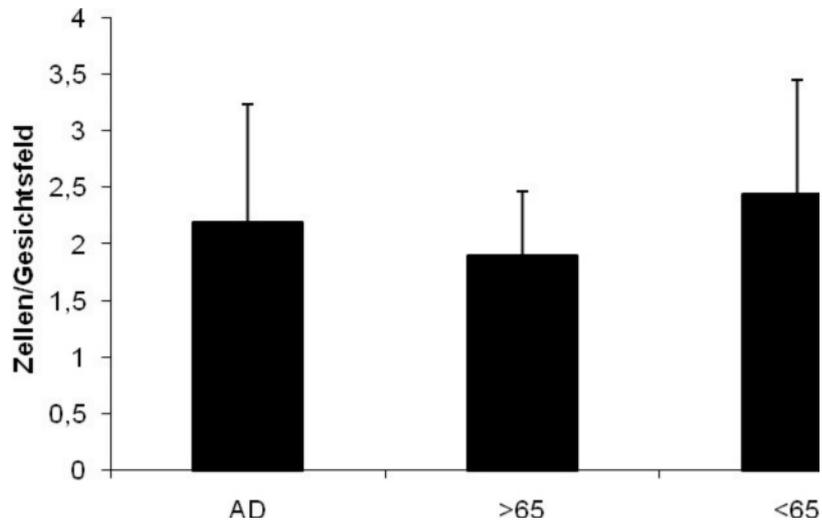


Abb. 25, **Kortex**: Verteilung Fibrinogen-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

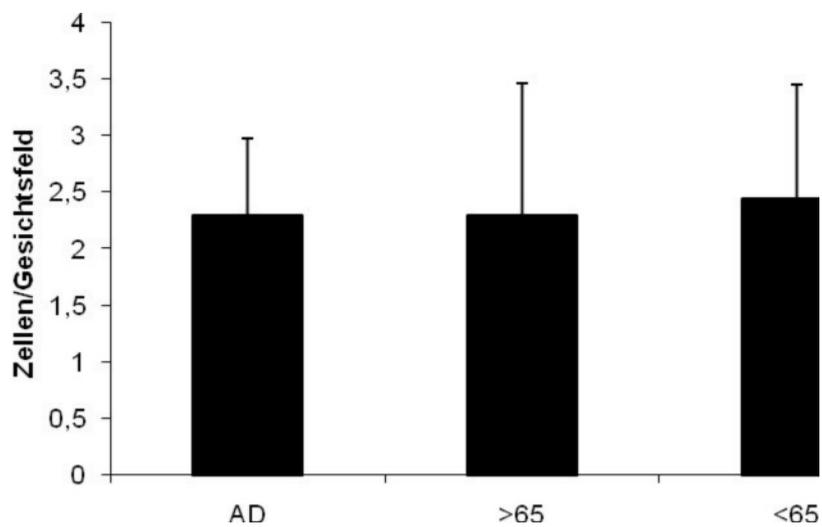


Abb. 26, **Hippocampus**: Verteilung Fibrinogen-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

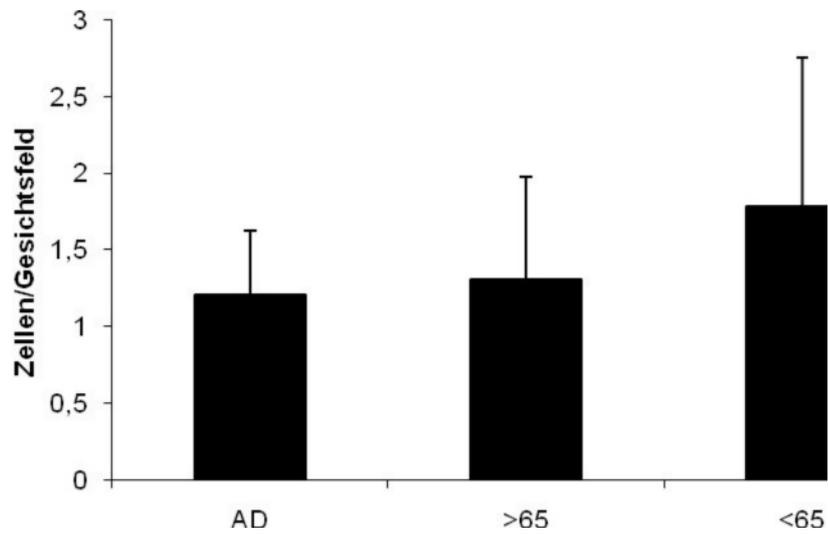


Abb. 27, **Kortex**: Verteilung Fibrinogen-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

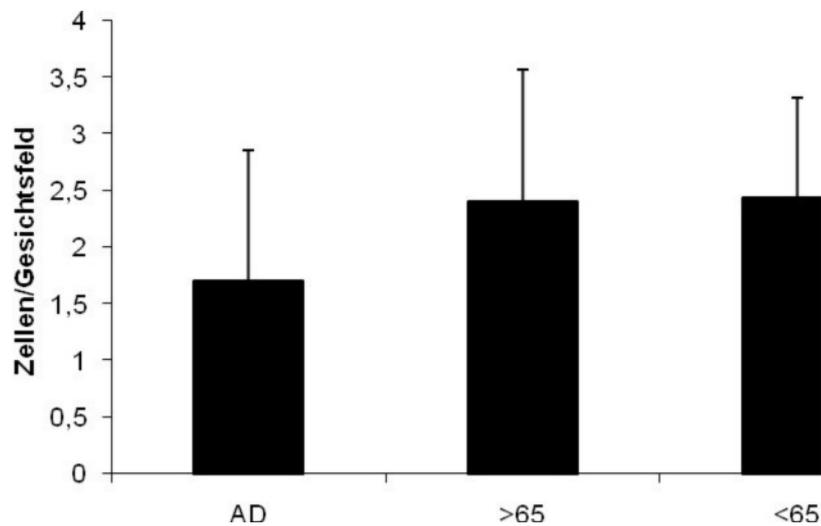


Abb. 28, **Hippocampus**: Verteilung Fibrinogen-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

4.1.4 Immunhistochemische Analyse von α 1-saurem-Glykoprotein

α 1-saures-Glykoprotein ist ein Plasmaprotein, das eine bisher kaum erforschte Rolle bei der körpereigenen Entzündungsreaktion spielt. Es existieren bisher keine Daten über Vorkommen und Funktion dieses Proteins im Hirngewebe.

In dieser Arbeit sollte nicht nur das Vorkommen, sondern auch eine mögliche Korrelation zwischen α 1-saurem-Glykoprotein und der Alzheimerpathologie bzw. physiologischen Altersvorgängen herausgearbeitet werden. Es wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt, die semiquantitativ analysiert wurden. Im Ergebnis zeigte sich, dass das α 1-saure-Glykoprotein in Neuronen und Gliazellen identifiziert werden konnte.

Der Vergleich zwischen kortikalem und hippocampalen Hirngewebe von AD-Patienten und >65-jährigen Individuen (Tab. 8) zeigte keine signifikanten Verteilungsunterschiede für α 1-saure-Glykoprotein-positive Neurone und Gliazellen (Abb. 30, 31 und 32).

	Glia kortikal	Glia hippocampal	Neurone kortikal	Neurone hippocampal
AD	2,8 ± 0,63	2,6 ± 0,52	2,2 ± 0,79	3,2 ± 0,63
> 65	2,9 ± 0,74	2,8 ± 0,42	2,4 ± 0,52	3,4 ± 0,70
p	0,77	0,34	0,32	0,45

Tab.8, **α 1-saures Glykoprotein**: Im Vergleich zwischen AD-Patienten und hirngesunden >65-jährigen zeigten sich keine signifikanten Verteilungsunterschiede.

Ebenso wurden Gewebe von AD-Patienten mit Geweben von Patienten < 65 Jahre verglichen. Bei der Auswertung ergab sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung von α 1-saures-Glykoprotein-positiven Gliazellen (Abb. 29). Kortikal lag die Anzahl der positiven Gliazellen auf der verwendeten Skala für die Alzheimer-Patienten (Abb. 33 a und b) im Mittel bei 2,8 ± 0,63 und für die Individuen der Altersgruppe < 65 Jahre (Abb. 35 a und b) bei 2,22 ± 0,44 (p=0,038). Für hippocampale Neurone (AD:3,2 ± 0,63 Vs. < 65:3 ± 0,87, p=0,60) und Gliazellen (AD:2,6 ± 0,52 Vs. < 65:2,22 ± 0,66, p=0,20) sowie für kortikale Neurone (AD:2,2 ± 0,79 Vs. < 65:2,22 ± 0,66, p=0,74) ergaben sich beim Vergleich von Alzheimer-Patienten Vs. hirngesunde Patienten < 65 Jahre für das α 1-saure-Glykoprotein keine signifikanten Verteilungsunterschiede.

Danach wurden Gewebe von hirngesunden Patienten > 65 Jahre mit Geweben aus der Altersgruppe der < 65-jährigen verglichen. Sowohl für hippocampale als auch für kortikale Gliazellen fanden sich signifikante Unterschiede in der Verteilung α 1-saures-Glykoprotein-positiver Zellen. In hippocampalen Gliazellen lag der Wert auf der verwendeten Skala für hirngesunde Patienten > 65 Jahre (Abb. 34 a und b) im Mittel bei $2,8 \pm 0,42$ und auf Seiten der jüngeren Individuen bei $2,22 \pm 0,66$ ($p=0,039$). Kortikal zeigten α 1-saures-Glykoprotein-positiv Gliazellen in der Altersgruppe > 65 Jahre einen Wert von im Mittel $2,9 \pm 0,74$, während die < 65-jährigen lediglich einen Wert von $2,22 \pm 0,44$ ($p=0,032$) aufwiesen. Weder für hippocampale ($> 65:3,4 \pm 0,70$ Vs. $< 65:3 \pm 0,87$, $p=0,29$) noch für kortikale Neurone ($> 65:2,4 \pm 0,52$ Vs. $2,22 \pm 0,66$, $p=0,57$) ergaben beim Vergleich der α 1-saures-Glykoprotein-positiven Zellen zwischen den beiden hirngesunden Gruppen signifikante Unterschiede.

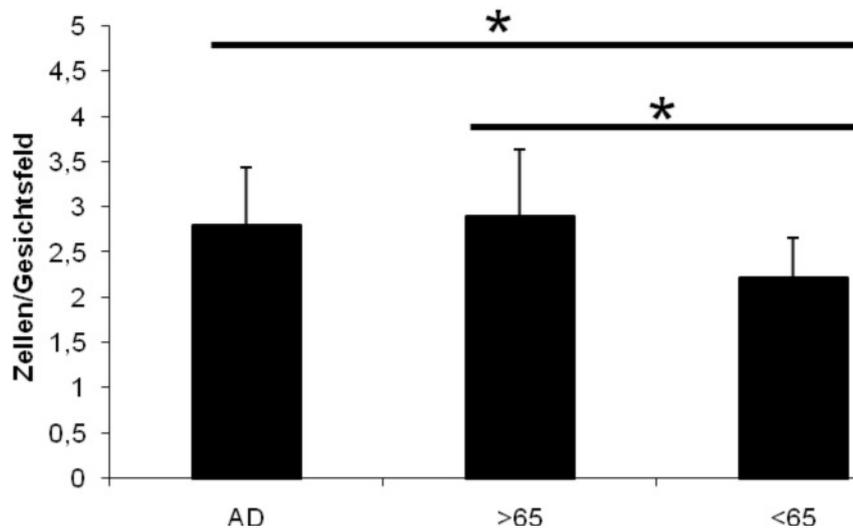


Abb. 29, **Kortex**: Verteilung alpha-1-saures-Glykoprotein-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen mit signifikantem Verteilungsunterschied zwischen AD-Patienten und <65-jährigen zugunsten der Erkrankten und >65-jährigen Individuen und <65-jährigen Individuen zugunsten der Älteren.

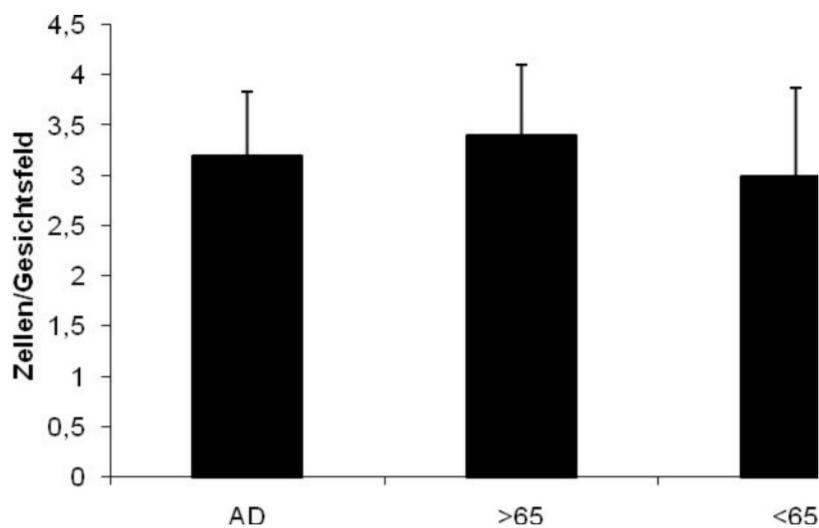


Abb. 30, **Hippocampus**: Verteilung alpha-1-saures-Glykoprotein-positiver **Gliazellen** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

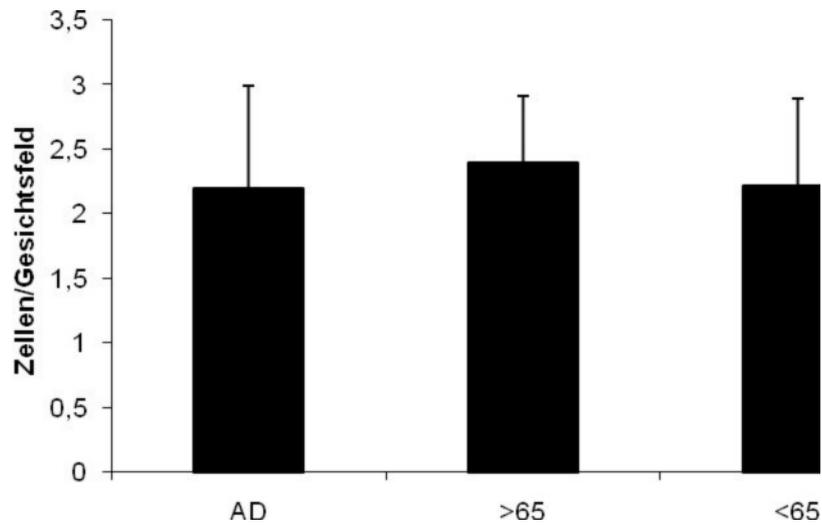


Abb. 31, **Kortex**: Verteilung alpha-1-saures-Glykoprotein-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

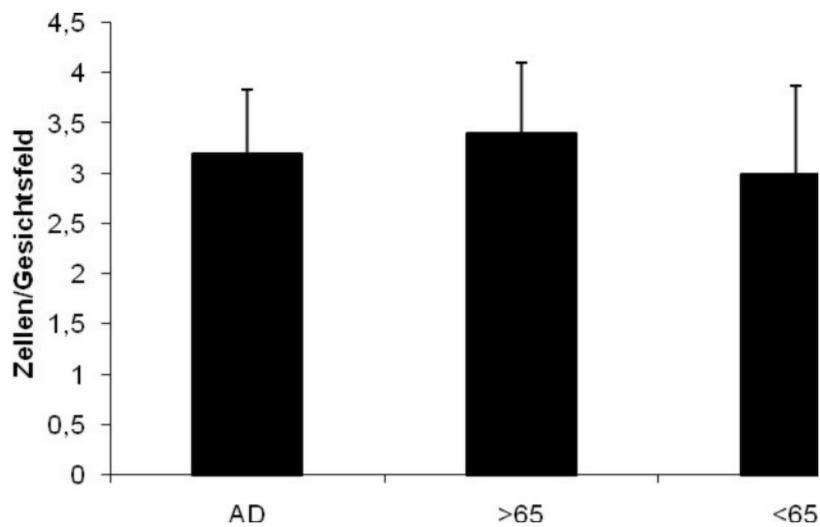


Abb. 32, **Hippocampus**: Verteilung alpha-1-saures-Glykoprotein-positiver **Neurone** von AD-Patienten, gesunden >65-jährigen und <65-jährigen Individuen ohne signifikante Verteilungsunterschiede.

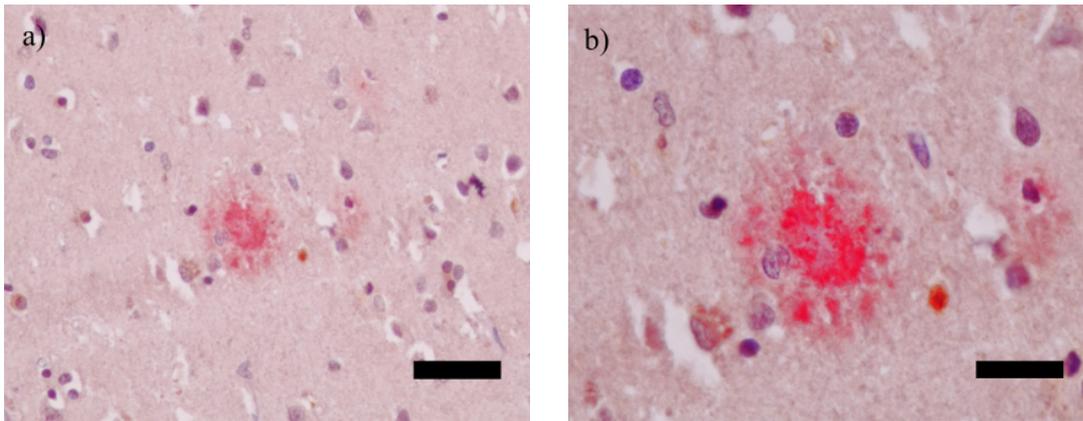


Abb. 33 a) und b): **Kortex** eines an AD-erkrankten Patienten mit alpha-1-saures-Glykoprotein-positiven Neuronen , Gliazellen und Abeta-Plaques in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-saures Glykoprotein wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt. In der semiquantitativen Analyse zeigte sich ein signifikanter Verteilungsunterschied zugunsten der an AD erkrankten Patientengruppe.

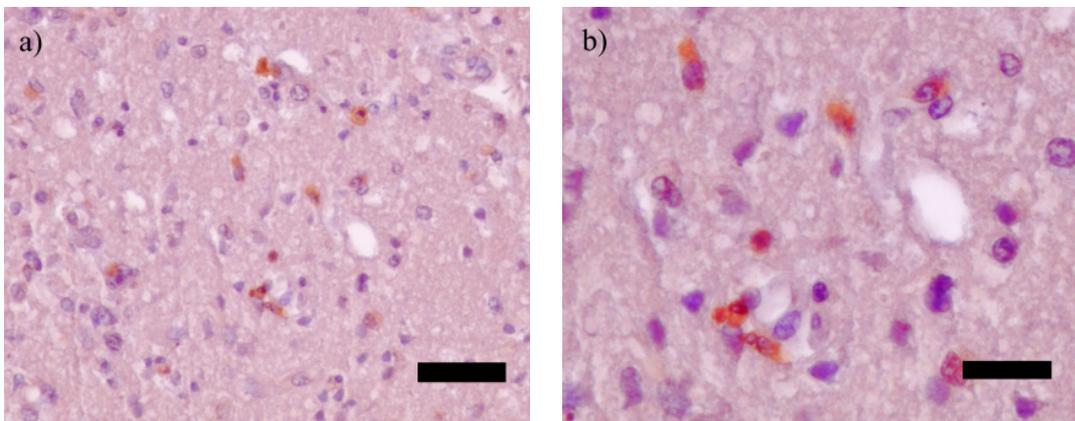


Abb. 34 a) und b): **Kortex** eines hirngesunden >65-jährigen Patienten mit alpha-1-saures-Glykoprotein-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-saures Glykoprotein wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

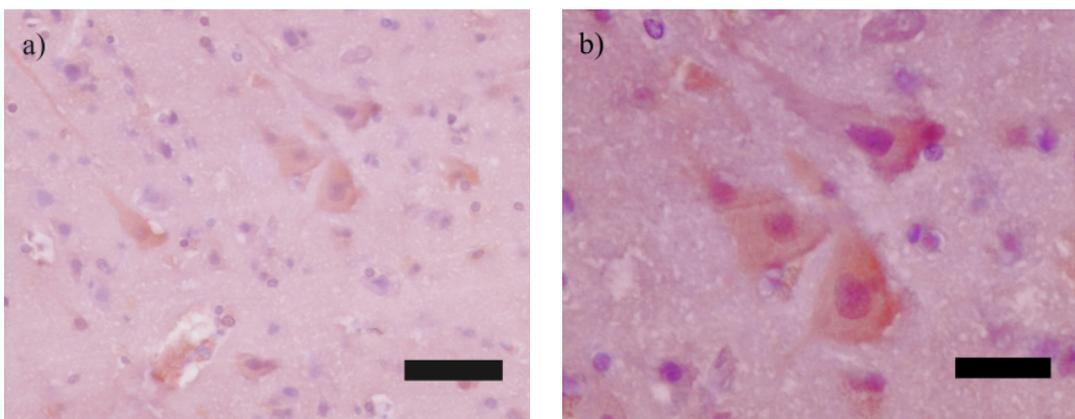


Abb. 35 a) und b): **Kortex** eines hirngesunden <65-jährigen Patienten mit alpha-1-saures-Glykoprotein-positiven Neuronen und Gliazellen in a) 200-facher und b) 400-facher Vergrößerung. alpha-1-saures Glykoprotein wurde mit AEC (braunrot) und Abeta (rosa) mit Neufuchsin gefärbt.

4.2 Lokalisation und Verteilung der positiven Zellen

Im Rahmen der semiquantitativen Analyse der immunhistochemisch behandelten Gewebe wurde auch die Verteilung und Lokalisation der für die vier untersuchten Proteine positiven Zellen berücksichtigt. Hierbei ergaben sich für α 1-anti-Chymotrypsin, Albumin, Fibrinogen und α 1-saures-Glykoprotein identische Resultate.

In allen untersuchten Gewebeschnitten wurden sowohl perivaskulär als auch intraparenchymal lokalisierte positive Zellen aufgefunden. Es konnte lediglich eine Assoziation zwischen vermehrtem Zellvorkommen und individueller Lokalisation bezüglich hippocampalen und kortikalen Geweben hergestellt werden. Hierbei fiel auf, dass sich hippocampal für alle vier untersuchten Proteine mehr positiv angefärbte Zellen befanden. Die positiven Zellen waren allerdings ohne erkennbares Muster in den einzelnen Schnitten angeordnet.

In allen von AD-Patienten entnommenen Geweben fanden sich A β -Plaques. In der Gruppe der hirngesunden > 65-jährigen Patienten ließen sich in 3 (Alter:84, 86, 93 Jahre) von 10 Schnitten Plaques nachweisen. Die Kontrollgruppe der Individuen < 65 Jahre zeigte in einem (Alter:47 Jahre) von 9 Fällen ein Vorhandensein von Plaques.

Sämtlichen Gewebeschnitte, die eine Plaquebelastung aufwiesen, wurden auf eine mögliche Assoziation zwischen A β -Plaques und positiv angefärbten Zellen untersucht. Eine Kolokalisation konnte in Einzelfällen für alle plaquebelasteten Gewebe dargestellt werden, jedoch fanden sich ebenso positive Zellen in Regionen, in denen keine Plaques nachgewiesen werden konnten.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Veränderungen in der zerebralen extrazellulären Matrix die Entstehung von pathologischen Prozessen begünstigen können. Hierzu wurden vier verschiedene Plasmaproteine, Albumin, Fibrinogen, α 1-anti-Chymotrypsin und α 1-saures Glykoprotein, untersucht und deren unterschiedliches Vorkommen in Gehirnen von AD-Patienten, gleichaltrigen Kontrollen und jüngeren Gesunden verglichen.

Diese Arbeit präsentiert eine erste semiquantitative Analyse der Expression der genannten Proteine in humanem Hirngewebe sowohl in Abhängigkeit von Alter, als auch vom Vorbestehen des Prototypen neurodegenerativer Erkrankungen, der Alzheimer-Demenz.

	<65-jährige, gesund			>65-jährige, gesund			>65-jährige, AD		
	Glia	Neurone	Plaque-ass.	Glia	Neurone	Plaque-ass.	Glia	Neurone	Plaque-ass.
α1-anti-Chymotrypsin	3,11± 0,93	3,44± 0,73	nein	2,8± 0,42	3,3± 0,82	nein	3,5± 0,53	3,7± 0,48	nein
Albumin	1,88± 0,33	3,11± 0,60	nein	2,2± 0,63	3,3± 0,82	nein	2,6± 0,52	3,3± 0,67	nein
Fibrinogen	2,44± 1,01	2,44± 0,88	nein	2,3± 1,16	2,4± 1,17	nein	2,3± 0,67	1,7± 1,16	nein
α1-saures Glykoprotein	2,22± 0,66	3,0± 0,87	nein	2,8± 0,42	3,4± 0,70	nein	2,6± 0,52	3,2± 0,63	nein

Tab.9, Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Proteine und deren Vorkommen im Hippocampus der verschiedenen Patientengruppen

	<65-jährige, gesund			>65-jährige, gesund			>65-jährige, AD		
	Glia	Neurone	Plaque-ass.	Glia	Neurone	Plaque-ass.	Glia	Neurone	Plaque-ass.
α1-anti-Chymotrypsin	3,22± 0,83	2,66± 1,0	nein	3,2± 0,42	2,6± 0,52	nein	3,7± 0,48	3,2± 0,42	nein
Albumin	1,88± 0,33	1,77± 0,83	nein	2,1± 0,99	1,4± 0,52	nein	2,6± 0,52	2,3± 0,48	nein
Fibrinogen	2,44± 1,01	1,77± 0,97	nein	1,9± 0,57	1,3± 0,67	nein	2,2± 1,03	1,2± 0,42	nein
α1-saures Glykoprotein	2,22± 0,44	2,22± 0,66	nein	2,9± 0,74	2,4± 0,52	nein	2,8± 0,63	2,2± 0,79	nein

Tab.10, Zusammenfassende Darstellung der untersuchten Proteine und deren Vorkommen im Kortex der verschiedenen Patientengruppen

5.1 α 1-anti-Chymotrypsin

Durch mikroskopische Untersuchungen von humanem Hirngewebe von AD-, hirngesunden gleichaltrigen und jüngeren Patienten konnten signifikante Verteilungsunterschiede von Neuronen und Gliazellen, die α 1-anti-Chymotrypsin enthalten, nachgewiesen werden. Dies gilt insbesondere für den Vergleich zwischen *post mortem*-Hirngewebe von AD-Patienten und hirngesunden altersentsprechenden Kontrollen. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Anzahl der α 1-anti-Chymotrypsin-positiven Gliazellen im Hippocampus und im Kortex der AD-Patienten im Vergleich zu hirngesunden gleichaltrigen Kontrollen.

Die Assoziation zwischen der Alzheimer'schen Erkrankung und einem vermehrten α 1-anti-Chymotrypsin wurde bereits aus verschiedenen Perspektiven beschrieben. Im Liquor von AD-Patienten zeigten sich signifikante Erhöhungen der α 1-anti-Chymotrypsin-Spiegel im Vergleich zum normal gealterten Menschen (Harigaya, 1995). Auch das Risiko im Verlauf des Lebens an einer Demenz vom Alzheimer-Typ zu erkranken, korreliert mit erhöhten α 1-anti-Chymotrypsin-Plasmaspiegeln (Engelhart, 2004). Diese Aussage wird durch das in der vorliegenden Arbeit gezeigte vermehrte Vorkommen von α 1-anti-Chymotrypsin in kortikalen Neuronen von AD-Patienten im Vergleich zu < 65-jährigen hirngesunden Kontrollen unterstrichen.

Es wird vermutet, dass α 1-anti-Chymotrypsin und A β interagieren und dadurch die Amyloidplaquebildung begünstigen können (Janciauskiene et al., 2001). Des Weiteren gilt es als erwiesen, dass α 1-anti-Chymotrypsin die Phosphorylierung von tau-Protein in Neuronen induzieren kann (Padmanabhan et al., 2006). Dies könnte die enge räumliche Assoziation zwischen Plaques und Nervenzellen erklären, in denen α 1-anti-Chymotrypsin nachgewiesen werden konnte.

5.2 Albumin

Albumin zeigt eine ähnliche Verteilung wie α 1-anti-Chymotrypsin. Es ergab sich eine signifikante Erhöhung von Albumin-positiven Zellen in Hirngewebe von AD-Patienten sowohl gegenüber hirngesunden gleichaltrigen als auch jüngeren Kontrollen. Wie bereits erwähnt wird vermutet, dass die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ein Einwandern von Serumproteinen in das Hirnparenchym entscheidend determiniert (Pakulski et al., 2000). Die beschriebenen Verteilungsunterschiede unterstützen die These, dass eine zerebrovaskuläre Pathologie im Sinne einer Schrankenstörung bei der Alzheimer'schen Erkrankung eine wichtige Position einnimmt (Wada, 1998, Kalaria, 2003, Bowman et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine signifikant erhöhte Konzentration von Albumin bei an AD erkrankten Patienten vorliegt. Dies unterstützt die Vermutung, dass Albumin eine Rolle bei der Krankheitsentstehung der AD spielen könnte. *In vitro* konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine fehlerhafte Faltung des Proteins die Formation von Amyloidfibrillen begünstigt (Taboada et al., 2006). Beim Vergleich zwischen alten und jungen Gesunden ergaben sich keine signifikanten Expressionsunterschiede für Albumin. Dem widerspricht eine Untersuchung, in der erniedrigte Serumplasmaspiegel für Albumin im Alter nachgewiesen wurden und damit auf eine reziproke Beziehung zwischen Albuminvorkommen und Lebensalter geschlossen wurde (Maes et al., 1999). Somit wäre es jedoch auch denkbar, dass es im höheren Lebensalter zu einer physiologischen Abnahme der Albuminmenge im menschlichen Organismus kommt. Das Fehlen dieses Mechanismus könnte die vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf den Vergleich zwischen AD-Patienten und gesunden Individuen stützen.

5.3 Fibrinogen

Für Fibrinogen zeigten sich im Vergleich der drei Gruppen untereinander weder kortikal noch hippocampal signifikante Unterschiede bzgl. der Anzahl positiv angefarbter Zellen. Dies bestätigt bereits vorhandene Erkenntnisse aus einer anderen immunhistochemischen Arbeit, in der ebenfalls kein Unterschied in der Verteilung von Fibrinogen bei AD-Patienten und hirngesunden gealterten Menschen festgestellt wurde (Alafuzoff et al., 1987). Dies lässt erkennen, dass eine mögliche mit Fibrinogen assoziierte zerebrale Pathologie nichts mit dessen vermehrtem Vorkommen zu tun hat. Die Resultate beim Vergleich zwischen AD-Patienten und in jungem Lebensalter verstorbenen Individuen widersprechen der These, dass ein vermehrtes Vorkommen von Fibrinogen das Risiko an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken, erhöht (Oijen van et al., 2005). Vielmehr sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass Fibrinogen, obwohl es nicht von neuronalen Zellen synthetisiert werden kann, eine Rolle im menschlichen Gehirn zukommt, die nicht mit der AD in Zusammenhang gebracht werden kann. Damit sprechen die vorliegenden Resultate nicht für die Theorie, dass ein Vorkommen von Fibrinogen in neuronalen Zellen zwingend mit einer Pathologie, z.B. einer vaskulären Problematik, einhergehen muss (Adams et al., 2004).

5.4 α 1-saures Glykoprotein

In der Analyse des α 1-sauren Glykoproteins konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass dessen Vorkommen in Neuronen und Gliazellen im Hirngewebe bei AD-Patienten im Vergleich zu < 65-jährigen Individuen signifikant erhöht ist. Während es zwischen Hirngewebe von AD-Patienten im Vergleich zu normal gealterten Patienten keine Unterschiede aufwies, ergaben sich auch beim Vergleich zwischen hirngesunden <65-jährigen und älteren ebenfalls hirngesunden Individuen signifikante Differenzen. So lagen beim normal Gealterten im Vergleich zum jungen Menschen deutlich mehr positiv angefarbte Gliazellen, sowohl kortikal als auch hippocampal vor. Dies könnte als ein weiterer Hinweis dafür gewertet werden, dass die Funktion der Blut-Hirn-Schranke mit zunehmendem Alter abnimmt (Pakulski et al., 2000). Wie bereits beschrieben kommt es im Alter ebenfalls zu einem vermehrten Anfallen von Sauerstoffradikalen, die ursächlich für biologische Alterungsprozesse verantwortlich gemacht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten dafür sprechen, dass α 1-saures Glykoprotein im Gehirn des älteren hirngesunden Menschen Alterungsprozesse verlangsamt, da es die Bildung von Sauerstoffradikalen verringert (Matsumoto et al., 2007).

Beim Vergleich zwischen AD-Patienten und jungen gesunden Patienten wurde im Kortex von an AD erkrankten Individuen eine signifikant höhere Anzahl von auf α 1-saures Glykoprotein-positiven Gliazellen nachgewiesen. Dies könnte die These stützen, dass es im Rahmen der AD zu inflammatorischen Prozessen kommt (McGeer et McGeer, 2001), die letztendlich sowohl zu einer Schrankenstörung als auch zu einer Veränderung der Komposition der EZM führen könnten.

5.5 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix determiniert die physikochemischen Eigenschaften und die dreidimensionale Organisation des Hirngewebes. Sämtliche Zellen benötigen eine funktionierende EZM zur Regulation ihres Stoffwechsels, um Konzentrationsänderungen verschiedener intrazellulärer Proteine zu regulieren. Nicht nur das Hirnparenchym selbst, sondern auch die Blut-Hirn-Schranke ist abhängig von einer intakten extrazellulären Matrix. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Serumproteine in *post-mortem*-entnommenen Hirngewebe von AD-Patienten, physiologisch gealterten und jungen Individuen vorkommen. Dabei zeigte sich jedoch für drei dieser Proteine eine signifikant erhöhte Anzahl positiv anfärbbarer Zellen im Hirngewebe von AD-Patienten im Vergleich mit der gleichaltrigen und der jüngeren Kontrollgruppe. Diese Verteilungsunterschiede widersprechen einer Studie, in der postuliert wurde, dass es *post mortem* zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und damit zu einer unspezifischen Ansammlung von Serumproteinen im Hirnparenchym kommt (Munoz et al., 1997).

Es wurde gezeigt, dass die für die AD typischen Plaques eine Vielzahl von extrazellulären Proteinen beinhalten (McGeer et al., 1994). Es konnte bisher allerdings nur *in vitro* nachgewiesen werden, dass Serumproteine eine Aggregationstendenz zeigen und somit eine Plaquebildung begünstigen (Taboada et al., 2006). Welche Bedingungen *in vivo* herrschen müssen, damit es zu einer fehlerhaften Faltung und zur Aggregation von Proteinen im humanen Hirnparenchym kommt, ist ungeklärt. Für die Aggregation des unlöslichen Amyloidpeptids wird angenommen, dass es ab einer bestimmten Konzentration von Monomeren zu einem Ungleichgewicht im Hirnstoffwechsel kommt. Als Reaktion auf das

vermehrte Angebot polymerisieren dann die Monomere zu Plaques (Koo et al., 1999). Es scheint demnach eine ursächliche Störung beim Abtransport zum einen der Monomere und zum anderen beim Abbau der Plaques vorzuliegen. Dieser wird wie oben beschrieben von den Komponenten der EZM gewährleistet. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass die EZM bei der AD in ihrer Funktion kompromittiert ist, da auch die untersuchten Proteine im Hirngewebe von AD-Patienten vermehrt nachgewiesen wurden.

Desweiteren wird diskutiert, inwieweit intrazelluläre Ablagerungen von unphysiologisch gefalteten Proteinen den eigentlichen pathologischen Mechanismus der AD darstellen könnten (Selkoe, 2003). Ebenso wäre auch eine intrazelluläre Überproduktion von Proteinen denkbar. Beide Annahmen werden durch die vorliegenden Ergebnisse unterstützt, da sowohl gliale als auch neuronale Zellen von AD-Patienten signifikant häufiger Protein beinhalten als dies beim Gesunden, gleichgültig ob älter oder jünger als 65 Jahre, der Fall ist.

5.6 Zusammenfassung und Perspektiven

Die AD ist als häufigste Demenzform im Rahmen der derzeitigen demographischen Entwicklung in den Industrieländern Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Die ursächliche Pathologie der Erkrankung ist die Entstehung amyloider Plaques, die in humanem Hirngewebe *post mortem* nachgewiesen werden konnten. Mit Hilfe immunhistochemischer Analysen von *post mortem*-entnommenen humanem Hirngewebe wurden in der vorliegenden Arbeit Neurone und Gliazellen auf Positivität für die Serumproteine Albumin, Fibrinogen, α 1-anti-Chymotrypsin und α 1-saures-Glykoprotein untersucht. Dabei wurde im Rahmen einer semiquantitativen mikroskopischen Analyse der neuronalen Zellen festgestellt, dass die Anzahl der positiv angefärbten Neurone und Gliazellen bei AD-Patienten im Vergleich zu hirngesunden Kontrollgruppen signifikant erhöht war.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit peripher synthetisierte Serumproteine im Hirngewebe des an Alzheimer erkrankten bzw. des alternden Menschen vorkommen und ob Unterschiede in deren Verteilung bestehen. Die signifikante Erhöhung der für Albumin-, α 1-anti-Chymotrypsin- und α 1-saures-Glykoprotein-positiven neuronalen Zellen bei AD-Patienten im Vergleich zu hirngesunden Kontrollen deutet auf eine Transportproblematik mit zentraler Beteiligung der den Hirnstoffwechsel organisierenden Komponenten der EZM hin.

Dabei gilt es zu bedenken, dass es offensichtlich keinerlei räumlichen Zusammenhang zwischen Zellen mit Positivität für eines der genannten Proteine und amyloiden Plaques gibt. Dies deckt sich mit am Tiermodell durchgeführten Studien, in denen keine Assoziation zwischen Plaquelokalisation und Neuronenuntergang nachgewiesen werden konnten. Eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Proteine und einer Neuronenschädigung konnte nicht getroffen werden. Es scheint offensichtlich, dass die A β -Plaques, trotz ihrer *in vitro* nachgewiesenen neuronalen Toxizität nicht allein in der Lage sind, die neuronale Degeneration zu erklären. Man vermutet daher, dass kleine lösliche Bestandteile des A β -Komplexes, sog. A β -Oligomere, an verschiedenen Punkten der interneuronalen Signalkaskaden wirken und diese stören. Dies gilt insbesondere für die EZM, deren Proteine durch die Aggregation amyloider Plaques in ihrer Funktion entscheidend kompromittiert sind.

Es ist jedoch bekannt, dass A β -Plaques auch bei nicht als AD-Patient klassifizierten Individuen nachgewiesen wurden. Daher ist es in Zukunft entscheidend, den pathogenetischen Horizont in Bezug auf die AD auch auf andere Bereiche zu erweitern. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass - nach heutigem Wissensstand - ausschließlich peripher synthetisierte Serumproteine eindeutig im menschlichen Gehirn vorkommen. Die genaue Herkunft der Proteine ist allerdings nicht endgültig aufgeklärt. Eine intrazerebrale Genese konnte bis heute weder widerlegt noch bewiesen werden. In jedem Fall erscheint es logisch, dass die Proteine eine Funktion wahrnehmen und mitnichten erst nach dem Eintritt einer nichtphysiologischen Situation ins Hirnparenchym oder in neuronale Zellen gelangen. Der EZM, die die Rahmenbedingungen für sämtliche Stoffwechselprozesse und interzellulären Interaktionen im ZNS schafft, kommt hierbei eine entscheidende Rolle zu, der in Zukunft, auch in Bezug auf andere zerebrale Pathologien, mehr Beachtung geschenkt werden sollte.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988): Immunochemical identification of the serine protease inhibitor alpha 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell*, 52(4), 487-501
- Adams RA, Passino M, Sachs BD, Nuriel T, Akassoglou K (2004): Fibrin Mechanisms and Functions in Nervous System Pathology. *Molecular Interventions*, Vol. 4, Issue 3, 163-176
- Alafuzoff I, Adolfsson R, Grundke-Iqbal I et Winblad B (1987): Blood-brain barrier in Alzheimer dementia and in non-demented elderly. *Acta Neuropathol*, 73, 160-166
- Alzheimer, A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr. Psychisch. Gerichtl. Med*, 64, 146–148
- Bales KR, Verina T, Dodel RC et al. (1997): Lack of Apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nature Genet*, 17, 263-264
- Becker RE, Greig NH (2008): Alzheimer's Disease Drug Development in 2008 and Beyond: Problems and Opportunities. *Curr Alzheimer Res*, 5(4), 346–357
- Bickel H (2001): Demenzen im höheren Lebensalter: Schätzungen des Vorkommens und der Versorgungskosten. *Z Geronto Geriat* 34, 108-115
- Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Bobinski M (1997): Relationships between Regional Neuronal Loss and Neurofibrillary Changes in the Hippocampal Formation and Duration and Severity of Alzheimer's Disease. *Jour Neuropath and Exp Neurology*, Vol. 56, No. 4, pp. 414-420
- Bonneh-Barkay D, Wiley CA (2008): Brain Extracellular Matrix in Neurodegeneration. *Brain Pathology*, ISSN 1015-6305, 1-13
- Botella-Lopez A, Burgaya F, Gavin R, Garcia-Ayllon et al. (2006): Reelin expression and glycolysation patterns are altered in Alzheimer's disease. *PNAS* Vol. 103, No. 14, 5573-5578
- Bowman GL, Kaye JA, Moore M, Waichunas D et al. (2007): Blood–brain barrier impairment in Alzheimer disease - Stability and functional significance. *Neurology* 68, 1809–1814
- Braak H, Del Tredici K, Schultz C, Braak E (2000): Vulnerability of selected neuronal types to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 924, 53-61
- Breen KC, Bruce M, Anderton BH (1991): Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res* 28, 190–100
- Caceres J, Brandan E (1997): Interaction Between Alzheimer's Disease bA4 Precursor Protein (APP) and the Extracellular Matrix: Evidence for the Participation of Heparan Sulfate Proteoglycans. *Jour Cell Biochem* 65, 145–158
- Chen ZL et al. (1999): Neuronal Death and Blood-Brain-Barrier Breakdown after Excitotoxic Injury Are Independent Processes. *J Neuroscience*, 19(22), 9813-9820

- Chen ZL, Indyk JA, Strickland S (2003): The Hippocampal Laminin Matrix Is dynamic and Critical for Neuronal Survival. *Mol Biol Cell* Vol. 14, 2665-2676
- Clark RF, Goate RM (1993): Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, 50(11), 1164-72
- Coben LA, Danziger W, Storandt M (1995): A longitudinal EEG study of mild senile dementia of Alzheimer type: changes at 1 year and at 2.5 years. *Electroenceph clin Neurophysiol*, 103, 409-417
- Conde RC, Streit WJ (2006): Microglia in Aging Brain. *J Neuropath Exp Neurol*, Vol. 65, No.3, 199-203
- Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ (2006): Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia*, 53(5), 484-490
- Davies L et al. (1988): A4 amyloid protein deposition and diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology* 38, 1688-1693
- Delacourte A, Defossez A (1986): Alzheimer's disease: Tau Proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Science* 76 (2-3), 173-86
- Dik MG, Jonker C, Hack CE et al. (2005): Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology*, 64, 1371–1377
- Dow KE, Wang W (1998): Cell biology of astrocyte proteoglycans. *Cell Mol Life Sci* 54, 567-581
- Elder GA et al. (2006): Neurogenesis in Adult Brain and Neuropsychiatric Disorders. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, Vol. 73, No. 7, 931-940
- Engelhart MJ, Geerlings MI, Meijer J et al. (2004): Inflammatory Proteins in Plasma and the Risk of Dementia. The Rotterdam Study. *Arch Neurol*, 61, 668-672
- Engvall E, Ruoslahti E, and Miller EJ (1978): Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J Exp Med* 147, 1584–1595
- Fändrich M, Forge V, Buder K, Kittler M et al. (2003): Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *PNAS*, Vol. 100, No. 26, 15463–15468
- Fournier T, Medjoubi N, Porquet D (2000): Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482, 157-171
- Fukagawa NK (1999): Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999 Dec; 222(3), 293-8. Review
- Gauthier S, Herrmann N, Ferreri F, Agbokou C (2006): Use of memantine to treat Alzheimer's disease. *CMAJ* 175 (5), 501-502

- Goedert M, Crowther RA, Garner CC (1991): Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. Trends Neuroscience 14, 193-199
- Gupta A, Watkins A, Thomas P et al. (2004): Coagulation and inflammatory markers in Alzheimer's and vascular dementia. Int J Clin Pract, 59, 1, 52-57
- Gupta Bansal R, Frederickson RCA, Brunden KR (1995): Proteoglycan-mediated Inhibition of A β Proteolysis. J Biol Chem Vol. 270, No. 31, 18666-18671
- Harigaya Y, Shoji M, Nakamura T et al. (1995): Alphas-Antichymotrypsin Level in Cerebrospinal Fluid Is Closely Associated with Late Onset Alzheimer's Disease. Internal Medicine 34, 481-484
- Hartmann T (1999): Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. Eur Arch Psychiat Clin Neuroscience, 249, 291-298
- Herz J, Chen Y (2006): Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. Nature, Vol. 7, 850-859
- Hwang SR, Steineckert B, Kohn A et al. (1999): Molecular Studies Define the Primary Structure of α 1-Antichymotrypsin (ACT) Protease Inhibitor in Alzheimer's Disease Brains. J Biol Chem, Vol. 274, No. 3, 1821-1827
- Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS (1995): The toxicity *in vitro* of β -amyloid protein. Biochem J, 311, 1-16
- Jacobs JM (1978): Vascular Permeability and Neurotoxicity. Environmental Health Perspectives, Vol. 26, 107-116
- Janciauskiene S, Eriksson S, Wright HT (2001): A specific structural interaction of Alzheimer's peptide A β ₁₋₄₂ with α 1-anti-Chymotrypsin. Nature struct boil, Vol. 3, No. 8, 668-671
- Jia JP et al. (2004): Differential acetylcholine and cholin concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. Chin Med J, 117(8), 1161-1164
- Jiang Q et al. (2008): ApoE promotes the proteolytic degradation of A β . Neuron, June 12, 58(5), 681-693
- Kalaria RN (2003): The Blood-Brain Barrier and Cerebrovascular Pathology in Alzheimer's Disease. Ann NY Acad Sci, 113-125
- Kamath S, Lip, GY (2003): Fibrinogen: Biochemistry, epidemiology and determinants. QJM 96, 711-729.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A et al. (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature, 325, 733-736
- Katzman R (1988): Alzheimer's disease as an age-dependent disorder. Ciba Found Symp, 134, 69-85

- Koo EH, Lansbury PT, Kelly JW (1999): Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *PNAS*, 96, 9989-9990
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986): Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Medical Sciences Vol. 83*, pp. 4044-4048
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C et al. (1998): Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci*, Vol. 95, 6448–6453
- Lansbury PT, Lashuel HA (2006): A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, Vol 443, 774-779
- Lasn H, Winblad B, Bogdanovic N (2006): Neuroglia in the inferior olivary nucleus during normal aging and Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, Vol 10, No 1, 145-156
- Lasn H, Winblad B, Bogdanovic N (2001): The number of neurons in the inferior olivary nucleus in Alzheimer's disease and normal aging: A stereological study using the optical fractionator. *J Alzh Dis*, 3, 159–168
- Lee SY, Lim JW, Kim YM (2001): Effect of α 1-Acid Glycoprotein Expressed in Cancer Cells on Malignant Characteristics. *Mol. Cell*, Vol. 11, No. 3, 341-345
- Li YM, Lai MT, Xu M et al. (2000): Presenilin 1 is linked with gamma-secretase-activity in the detergent solubilized state. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 6138-6143
- Maes M, DeVos N, Wauters A, et al. (1999): Inflammatory markers in younger vs elderly normal volunteers and in patients with Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*, 33, 397–405
- Matsumoto K, Kadowaki D, Kikuchi M, Koji N, Nishi K et al. (2007): α 1-Acid Glycoprotein Suppresses Rat Acute Inflammatory Paw Edema through the Inhibition of Neutrophils Activation and Prostaglandin E2 Generation. *Biol Pharm Bull*, 30(7), 1226-1230
- McGeer EG, McGeer PL (2001): Innate Immunity in Alzheimer's Disease. *Molecular Interventions*, Vol. 1, Issue 1, 22-29
- McGeer PL, Klegeris A, Walker DG, Yasuhara, McGeer EG (1994): Pathological Proteins in Senile Plaques. *Tohoku J Exp Med*, 174, 269-277
- Milner R, Huang X, Jianfeng Wu J, Nishimura S et al. (1999): Distinct roles for astrocyte α v β 5 and α v β 8 integrins in adhesion and migration. *Jour Cell Sci* 112, 4271-4279
- Mohs RC, Cohen L (1988): Alzheimer's Disease Assesment Scale (ADAS). *Psychopharmacol Bull*, 24, 627-628
- Mönning U, Sandbrink R, Weidemann A, Banati RB, Masters CL, Beyreuther K (1995): Extracellular Matrix Influences the Biogenesis of Amyloid Precursor Protein in Microglial Cells. *J Biol Chem*, Vol. 270, No. 13, 7104-7110

- Morgan C, Instrosa NC (2001): Interactions of laminin with the amyloid β peptide. Implications for Alzheimer's disease. *Brazil J Med Biol Research*, 34, 597-601
- Munoz DG, Erkinjuntti T, Gaytan-Garcia S, Hachinski V (1997): Serum Protein Leakage in Alzheimer's Disease Revisited. *Ann NY Acad Sci*, 173-187
- Nilsson LNG, Bales KR, DiCarlo G et al. (2001): α -1-Antichymotrypsin Promotes beta-Sheet Amyloid Plaque Deposition in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neuroscience*, 21(5), 1444-1451
- Nunomura A et al. (2001): Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(8), 759-767
- Oijen van M, Witteman JC, Hofman A, Koudstaal PJ (2005): Fibrinogen Is Associated With an Increased Risk of Alzheimer Disease and Vascular Dementia. *Stroke*, 36, 2637-2641
- Padmanabhan J, Levy M, Dickson DW (2006): Alpha1-antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in Alzheimer's disease brain, induces tau phosphorylation in neurons. *Brain* 129, 3020-3034
- Pakulski C, Drobnik L, Millo B (2000): Age and sex as factors modifying the function of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Med Sci Monit* 6(2), 314-318
- Parathath SR, Parathath S, Tsiriska SE (2006): Nitric Oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain-barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Science* 119, 339-349
- Pasternack JM, Abraham CR, Van Dyke BJ, Potter H (1989): Astrocytes in Alzheimer's disease gray matter express alpha 1-antichymotrypsin mRNA. *Am J Pathol*, 135(5), 827-834
- Patre d.PL, Gelman BB (1997): Microglial Cell Activation in Aging and Alzheimer Disease: Partial Linkage between Neurofibrillary Tangle Burden in the Hippocampus. *J Neuropath*, Vol. 56, No.2, 143-149
- Perry G et al. (1998): Reactive oxygen species mediate cellular damage in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 1(1), 45-55
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991): In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res*, 563(1-2), 311-4
- Roberson ED et Mucke L (2007): 100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. *Science*, Vol. 314, 781-784
- Ross CA, Poirier MA (2004): Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature*, Juli, 10-17
- Ryu JK, McLarnon JG (2008): A leaky blood-brain barrier, fibrinogen infiltration and microglial reactivity in inflamed Alzheimer's disease brain. *J Cell Mol Med*, postprint, 1-43

- Schmitz C, Rutten BPF, Pielen A, Schäfer S et al. (2003): Animal Model Hippocampal Neuron Loss Exceeds Amyloid Plaque Load in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *American Journal of Pathology*, Vol. 164, No. 4, 1495-1502
- Schultz DR, Arnold PA (1990): Properties of Four Acute Phase Proteins: C-reactive Protein, Serum Amyloid A Protein, α 1-acid Glycoprotein, and Fibrinogen. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, Vol 20, No 3, 129-147
- Selkoe DJ (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol.Rev.* 81, 741-766.
- Selkoe DJ (2003): Folding proteins in fatal ways. *Nature*, Vol. 426, 900-905
- Selkoe DJ (2004): Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol*, Vol. 6, Nr. 11, 1054-1062
- Simic G, Kostovic I, Windblad B, Bogdanovic N (1997): Volume and Number of Neurons of the Human Hippocampal Formation in Normal Aging and Alzheimer's Disease. *Jour Comp Neurology*, 379, 482–494
- Smith MA et al. (1997): Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neuroscience*, 17(8), 2653-2657
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL (2004): Dystrophic Microglia in the Aging Brain. *Glia*, 45, 208-212
- Styren SD, Kamboh MI, DeKosky S (1998): Expression of Differential Immune Factors in Temporal Cortex and Cerebellum: The Role of α -1-Antichymotrypsin, Apolipoprotein E, and Reactive Glia in the Progression of Alzheimer's Disease. *Jour Comp Neur*, 396, 511–520
- Taboada P, Barbosa S, Castro E, Mosquera V (2006): Amyloid Fibril Formation and Other Aggregate Species Formed by Human Serum Albumin Association. *J Phys Chem B*, 110, 20733-20736
- Tandon A, Fraser P (2002): The presenilins. *Genome Biology*, 3(11): reviews. 3041.1-3014.9
- Vetrivel KS et al. (2006): Pathological and physiological functions of presenilins. *Molecular Neurodegeneration*, 1: 4
- Wada (1998): Blood-Brain Barrier Permeability of the Demented Elderly as Studied by Cerebrospinal Fluid-Serum Albumin Ratio. *Internal Medicine* 37, 509-513
- Wang X, DeKosky ST, Luedeking-Zimmer E et al. (2002): Genetic variation in α 1-antichymotrypsin and its association with Alzheimer's disease. *Hum Genet* 110, 356–365
- Younkin SG (1995): Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 37, 287-288
- del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S et al. (2006): Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem Soc Transactions*, Volume 34, part 6, 1261-1266

del Zoppo GJ and Milner R (2006): Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 26, 1966–1975

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender für die interessante Aufgabenstellung und die Unterstützung beim Fertigstellen der endgültigen Fassung meiner Dissertation.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Faßbender, im Einzelnen Nadine, Andrea, Frau Dr. M. Letiembre und Herrn Dr. A. Liu. Ganz besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. Silke Walter, die mir, wann immer es ihr Terminkalender zuließ, mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meine Dissertation wäre nicht zustande gekommen, ohne die Bereitstellung der verwendeten Gewebeproben, wofür ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. W. Feiden (Universität des Saarlandes) und Herrn Prof. Dr. M. Glatzel (Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf) bedanken möchte.

Mein Abschlussdank gebührt zum einen meinen Eltern, deren förderliche Penetranz (besonders väterlicherseits), sicherlich auch großen Anteil an der Fertigstellung meiner Doktorarbeit hatte. Und zum anderen meiner Freundin Line, die mir, trotzdem ich immer wieder die Tabulator-Taste benutzte, geduldig bei Problemen mit diversen Benutzeroberflächen behilflich war.

Ebenso sei allen denen gedankt, die nicht namentlich erwähnt wurden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8 Lebenslauf

Mein Name ist Jörn Müller und ich wurde am 24.10.1979 in Sittard/Niederlande geboren.

Ich besuchte 1985/86 die erste Grundschulklasse der International AFCENT-School in Brunssum. Nach dem Umzug meiner Eltern nach Bad Ems ging ich dort von 1986-89 auf die Freiherr-vom-Stein-Schule. Danach besuchte ich das Goethe-Gymnasium in Bad Ems und im Jahr 1998 schloss ich meine schulische Laufbahn mit dem Abitur ab.

Im Anschluss absolvierte ich den 10-monatigen Grundwehrdienst und begann im Oktober 1999 eine Krankenpflegeausbildung am Katholischen Klinikum Koblenz, die ich mit dem Krankenpflegeexamen im September 2002 beendete.

Im selben Jahr begann ich das Medizinstudium an der Universität des Saarlandes in Homburg. Im August 2004 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung.

Das erste klinische Studienjahr verbrachte ich an der Universität von Valladolid/Spanien.

Im Verlauf meines Studiums habe ich Famulaturen in den Fachrichtungen Innere Medizin im Universitätskrankenhaus in Valladolid/Spanien (August 2005), Allgemeinmedizin in Bad Ems (September 2006), Orthopädie und Neurologie am Universitätsklinikum in Homburg (März 2006 und März 2007) abgeleistet.

Im April 2006 begann ich meine experimentelle Doktorarbeit mit dem Thema „Korrelation von Serumproteinen mit Amyloidablagerung im gesunden und Alzheimer erkrankten Hirnparenchym“ bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Faßbender in der Abteilung Neurologie der Universität des Saarlandes in Homburg. Im Zeitraum von Mai 2006 bis August 2007 beendete ich den experimentellen Teil der Doktorarbeit und begann, die Dissertation zu verfassen.

Im August 2007 begann ich mein Praktisches Jahr an der Universidad Católica de Santa Maria in Arequipa, Peru mit dem Pflichtfach Chirurgie. Das Innere-Tertial absolvierte ich an der Universität von Oslo, Norwegen und das Wahlfach Anästhesie am Klinikum Winterberg in Saarbrücken.

8 Lebenslauf

Im Zeitraum zwischen Oktober und November 2008 legte ich die schriftliche und mündliche Staatsexamensprüfung im Fachbereich Humanmedizin ab.

Im April 2009 trat ich meine Assistenzarztstelle in der Abteilung für Knochenmark- und Stammzelltransplantation an der Deutschen Klinik für Diagnostik in Wiesbaden an.

Ich habe sehr gute Sprachkenntnisse in Englisch und Spanisch und Grundkenntnisse in Norwegisch.