

Aus der Abteilung Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Additiver Mikroglia-vermittelter Neuronenschaden durch β -Amyloid
und bakterielle Toll-like-Rezeptor-Agonisten in primären murinen
Mikroglia-Neuronen-Kokulturen**

Entwicklung eines Auswertungsalgorithmus zur Quantifizierung des Neuronenschadens
mit Hilfe einer Software zur objektorientierten Bildanalyse

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Tobias Loleit, geb. Hoffmann
aus
Leinefelde

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Nau

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. T. Dresbach

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2012

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Demenz vom Alzheimer Typ	1
1.3	Mikrogliale und inflammatorische Vorgänge des innaten Immunsystems im ZNS	3
1.4	Klinische Verschlechterung von neurodegenerativen Erkrankungen im Rahmen von systemischen Infektionen	6
1.5	Hypothese	7
2.	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.2	Methoden	11
2.2.1	Zellkulturen	11
2.2.1.1	Primäre murine Mikroglia-Kultur	11
2.2.1.2	Primäre murine Neuronen-Kultur	12
2.2.1.3	Primäre murine Mikroglia-Neuronen-Kokultur (MG-N-Kokultur)	13
2.2.1.4	Stimulation der murinen MG-N-Kokultur	13
2.2.1.5	Beendigung der Stimulation der murinen MG-N-Kokultur	13
2.2.1.6	Färbung mit Map-2 und Hämalaun	13
2.2.1.7	Fotoaufnahmen der Kokulturen	14
2.2.2	Computergestützte Auswertung	14
2.2.3	Statistik und Darstellung	18
3.	Ergebnisse	20
3.1	Vorüberlegungen und Probleme der Quantifizierung des Neuronenschadens	20
3.2	Stimulation der MG-N-Kokultur mit der endogenen Substanz A β , den exogenen Substanzen P ₃ C und LPS und deren Kombination	24
3.2.1	Stimulation der MG-N-Kokultur mit der endogenen Substanz A β , der exogenen Substanz P ₃ C und deren Kombination	26

3.2.2	Stimulation der MG-N-Kokultur mit der endogenen Substanz A β , der exogenen Substanz LPS und deren Kombination	28
3.3	Stimulation der MG-N-Kokulturen mit den exogenen Substanzen in Form des TLR-2-Agonisten P ₃ C und des TLR-9-Agonisten CpG und deren Kombination	31
3.4	Einfluss von endogenen und exogenen Agenzien auf primär murine N-Kulturen	35
4.	Diskussion	36
5.	Zusammenfassung	41
6.	Anhang	42
6.1	Abkürzungsverzeichnis	42
6.2	Abbildungsverzeichnis	44
6.3.	Tabellenverzeichnis	46
6.4	Literaturverzeichnis	47
6.5	Publikationen im Zusammenhang mit dieser Dissertation	53

1. Einleitung

1.1 Einführung

Die Demenz vom Alzheimer Typ (AD) ist die in den Industrieländern am häufigsten vorkommende Form der Demenz, ihre Prävalenz steigt mit dem zunehmenden Alter (Bickel 2008). Die demographische Entwicklung der Bundesrepublik wird sich in den nächsten Jahren in Richtung der älteren Bevölkerung verschieben, wodurch es zu einer höheren Prävalenz und Inzidenz Alzheimererkrankter kommen wird. Die Ätiologie und Pathogenese der AD konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. In klinischen Beobachtungen fiel eine Progredienz der AD im Zusammenhang mit systemischen Infektionen auf. Dieser Pathomechanismus ist noch nicht gänzlich erforscht und ist zur Zeit Gegenstand diverser Untersuchungen. Eine wichtige Rolle wird hierbei den Mikrogliazellen (MG) zugeschrieben. Die MG, welche zum innatem Immunsystem gehören, haben nicht nur neuroprotektive, sondern auch neurodestruktive Eigenschaften. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Eigenschaften der Mikrogliazellen in diesem Zusammenhang besser zu verstehen. Dazu wird versucht, den durch Mikrogliazellen entstandenen Neuronenschaden *in vitro* zu quantifizieren. So sollen die Einflüsse einzelner endogener und exogener Substanzen sowie deren Kombination auf MG und die ggf. damit verbundene Neurotoxizität überprüft und eingestuft werden. Dadurch soll eine experimentelle Überprüfung bzw. Bestätigung der o.g. Beobachtung erfolgen und das Verständnis der pathologischen Hintergründe verbessert werden.

1.2 Demenz vom Alzheimer Typ

Die AD ist eine neurodegenerative, dementielle Erkrankung, deren Hauptsymptom die Gedächtnisstörung ist (Heinrich und Kwetkat 2004). Anfangs tritt meist eine Störung des Kurzzeitgedächtnisses auf, später können sich neben Störungen des Langzeitgedächtnisses auch noch weitere neurologische Symptome entwickeln, welche sich je nach Schädigungsort unterscheiden und unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Persönlichkeitsstruktur und affektive Ansprechbarkeit bleiben jedoch meist lange erhalten (Bickel 2008). Im späteren Verlauf bleibt eine Unterbringung in einer Pflegeeinrichtung meist unausweichlich. Die Patienten versterben zum größten Teil an Entkräftung, Mangelernährung oder Pneumonie (Bird 2010).

Das Lebenszeitrisiko, eine AD zu entwickeln, liegt ohne familiäre Vorbelastung bei 10% bis 12% (Bird 2010). Die Prävalenz liegt bei den über 65-Jährigen bei 6% bis 9%, steigt jedoch mit zunehmendem Alter an, so dass sie bei den 65- bis 69-Jährigen bei 1,2%, bei den 85- bis 89-Jährigen bei 23,9% liegt. Ähnlich entwickelt sich die Inzidenz mit dem

steigenden Alter: Für die 65– bis 69-Jährigen liegt sie bei 0,4% und für die 85– bis 89-Jährigen bei 6,5% (Bickel 2008). Damit ist die AD die häufigste Demenzform in Europa und Nordamerika (Bird 2010).

Es lassen sich zwei Verlaufsformen beobachten, zum einen die „*early onset*“-AD (EOAD) und zum anderen die „*late onset*“-AD (LOAD). Die EOAD zeichnet sich dadurch aus, dass sie ihre ersten klinischen Zeichen schon vor dem 60. bis 65. Lebensjahr zeigt und ihr Verlauf in den meisten Fällen eine schnellere Progredienz aufzeigt. Sie macht etwa einen Anteil von 1% bis 6% der AD aus, meist tritt sie im Rahmen einer familiären Häufung auf. Die LOAD beginnt erst nach dem 60. bis 65. Lebensjahr und weist eine langsamere Progredienz auf (Bird 2010).

Unter neuropathologischen Gesichtspunkten zeichnet sich die AD durch das Auftreten von β -Amyloid-Plaques, neurofibrillären Bündeln und einer Gefäßwandamyloidose im zentralen Nervensystem (ZNS) aus (Mohandas et al. 2009), deren Nachweis auch der Goldstandard bei der Diagnosesicherung post mortem ist (Bird 2010).

Die genaue Ätiologie und Pathogenese konnten noch nicht aufgeklärt werden. Eine Hypothese betrachtet das β -Amyloid-Peptid ($A\beta$) und dessen Entstehung aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) durch Proteolyse genauer. Für die Pathogenese der AD scheinen vor allem zwei Subtypen dieses Peptides von Belang zu sein, die Subtypen $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$. Es wird davon ausgegangen, dass im Normalfall ein Verhältnis von 10% $A\beta_{1-42}$ und 90% $A\beta_{1-40}$ bei der Proteolyse entsteht. Da die $A\beta_{1-40}$ -Subform besser löslich ist, langsam in eine β -Faltblattstruktur übergeht und vom Gehirn eliminiert werden kann, wird durch sie keine für eine AD neuropathologisch typische $A\beta$ -Ablagerung im Gehirn verursacht. Der $A\beta_{1-42}$ -Subtyp hingegen fügt sich fibrillär zusammen und lagert sich so im ZNS an. Kommt es nun durch eine beispielsweise genetische Veränderung zu einer Verschiebung dieses o.g. Verhältnisses, folgt daraus eine vermehrte Bildung von $A\beta_{1-42}$ und damit eine für die AD typische Anreicherung von $A\beta$ im ZNS (Mohandas et al. 2009).

Bei einer weiteren Hypothese, auf welche im Rahmen dieser Arbeit noch genauer eingegangen wird, stehen die Entzündungsreaktionen im Vordergrund. So konnte bereits 1995 experimentell nachgewiesen werden, dass die bei der AD vermehrt vorliegenden senilen Plaques im ZNS Mikrogliazellen zur Freisetzung von Neurotoxinen anregen (Giulian et al. 1995). Meda et al. zeigten ebenfalls 1995, dass $A\beta$ Mikrogliazellen aktiviert. MG kommen normalerweise in einer Art Ruhephase im ZNS vor. Durch eine Aktivierung kommt es unter anderem zu einer Expression von Major-Histocompatibility-Complex-II (MHCII)-Molekülen auf der Zelloberfläche (Nolte et al. 1996) sowie zur Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1β (IL- 1β) (Combs et al. 2001), Interleukin 6 (IL-6) (Mohandas et al. 2009) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF) (Combs et al. 2001, Mohandas et al. 2009). Weiterhin werden die MG zur Phagozytose (Nolte et al. 1996) angeregt und die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) (Ebert et al. 2005) stimuliert. Bei einer simultanen Stimulierung der MG durch $A\beta_{1-40}$ mit

Lipopolysacchariden (LPS), einem Toll-like-Rezeptor (TLR) -4-Agonist oder Pam3CSK (P₃C), einem TLR-2-Agonist, konnte eine additiv vermehrte Freisetzung von NO und TNF α im Vergleich zur alleinigen Stimulation in Kulturen muriner MG nachgewiesen werden (Lotz et al. 2005).

1.3 Mikrogliale und inflammatorische Vorgänge des innaten Immunsystems im ZNS

Das ZNS nimmt bei der Betrachtung immunologischer Vorgänge eine Sonderposition ein. Durch verschiedene Mechanismen ist es von den anderen Organsystemen zu unterscheiden. So gibt es im ZNS beispielsweise keine Lymphbahnen, auch gibt es im Vergleich zum peripheren Immunsystem kaum Antigen-präsentierende-Zellen (APC) und durch die Blut-Liquor-Schranke ist es von den peripheren Organsystemen getrennt (Ullrich 2005).

Die Blut-Liquor-Schranke ist eine natürliche Barriere, die das ZNS von den anderen Organsystemen trennt und so einen Übertritt von Zellen und großen Molekülen, wie z.B. im Blutsystem zirkulierenden Interleukinen, verhindert (Blatteis 1992).

Den MG kommt im Immunsystem des ZNS eine besondere Rolle zu. MG werden im Dottersack gebildet, somit handelt es sich bei MG nicht um Zellen neuronalen Ursprungs, sondern um während der Entwicklung eingewanderte Makrophagen, welche sich über verschiedene Entwicklungsschritte zu MG entwickeln und im ZNS verweilen (Hume et al. 1983, Perry et al. 1985). Damit sind die Mikrogliazellen die ortsgebundenen Makrophagen des ZNS (Perry und Gordon 1988). Bemerkenswert ist, dass zum Zeitpunkt der Einwanderung der Makrophagen in das ZNS die Blut-Hirn-Schranke bereits voll funktions-tüchtig ist und somit überwunden werden muss (Møllgård und Saunders 1986). Im Normalfall kommen die MG in einem verzweigten Phänotyp im Parenchym des ZNS vor (Perry et al. 2007). Dieser verzweigte Phänotyp erlaubt es den MG, einen gewissen Raum des ZNS-Parenchyms zu überwachen. Dabei sind die Zellen hochaktiv, d.h. die Zellen verändern ihre Ausläufer ständig (Nimmerjahn et al. 2005). Schon 1996 schreibt Kreutzberg, dass MG vermutlich in einer Art Überwachungsphase im ZNS vorliegen, da sie bereits auf kleinste Veränderungen in ihrer Umgebung mit einer schnellen Aktivierung reagieren. Weiterhin schreibt Kreutzberg in seiner Publikation von 1996, dass im Falle einer Aktivierung zwei Stadien zu unterscheiden sind. Zum einen eine Stufe, die nicht zur Phagozytose fähig ist, welche eine wichtige Rolle bei Reparaturmechanismen spielt, und zum anderen eine Stufe, in der eine Phagozytose möglich ist, um so Bakterien und Zellreste zu entfernen, und die auch im Zusammenhang mit Neuronenschädigung diskutiert wird. In diesem Rahmen wird durch Kreutzberg ein Tiermodell beschrieben, bei welchem nach der Durchtrennung des Nervus facialis eine regionale Aktivierung von Mikroglia-

zellen nachgewiesen werden konnte, die nicht zur Phagozytose fähig waren, bei welcher es aber unter anderem auch zur Expression von Komplementrezeptor 3, von Major-Histocompatibility-Complex-I-Molekül (MHCI)-, MHC-II-Antigenen und $TNF\alpha$ kommt. Außerdem konnte die Produktion von messenger-Ribonukleinsäure für den Transforming-Growth-Factor- β 1 (TGF- β 1) nachgewiesen werden, einem Zytokin, dem eine wichtige Rolle bei der Gewebereparatur zugewiesen wird. Bei dem o.g. Experiment persistierten die Mikrogliazellen für einige wenige Wochen im Gebiet der Schädigung, wurden aber nach und nach von hypertrophen Astrozyten abgelöst, welche sich lamellenartig um die Oberfläche der Nervenzellen legten und so eine mögliche Regeneration anbahnten. Wurde, im Gegensatz zur o.g. Durchtrennung des Nervus facialis, jedoch durch eine toxische Dosis Ricin ein selektiver Nervenzelluntergang provoziert, führte dies dazu, dass sich die Mikrogliazellen schnell in eine phagozytosefähige Form umwandelten und die Nervenzellreste phagozytierten (Kreutzberg 1996).

Es konnten aber nicht nur protektive MG-Eigenschaften nachgewiesen werden. So konnten Iliev et al. 2003 nachweisen, dass MG, welche durch den TLR-9-Agonisten Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG) stimuliert werden, eine erhöhte Ausschüttung von NO und $TNF\alpha$ aufweisen. Iliev et al. konnten 2003 in diesem Zusammenhang auch einen Untergang von Neuronen im Zellkulturmodell beobachten.

Kommt es beispielsweise durch eingedrungene Mikroorganismen zu einer Immunreaktion, reagiert zuerst das innate Immunsystem. Die MG, welche zum innaten Immunsystem gehören, erkennen zu den Mikroorganismen gehörende Produkte. Diese Produkte, die so genannten *Pathogen-associated-molecular-Patterns* (PAMPs), sind je nach Mikroorganismus verschieden. Zu einem der am besten untersuchten PAMPs gehört beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien. Ein besonderes Augenmerk bei der Untersuchung dieses „Erkennens“ wurde auf die Beteiligung von TLRs gelegt, deren Aktivierung über die Auslösung des Nuclear-Factor- κ B (NF κ B)-Signalweges zu einer Aktivierung des NF κ B-Transkriptionsfaktors führt und damit letztendlich eine Produktion von Zytokinen versucht (Nguyen et al. 2002).

Bei TLR handelt es sich um Transmembranproteine, welche auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) vorhanden sind. Die verschiedenen TLR - für Säugetiere sind mittlerweile 13 beschrieben (Kawai und Akira 2008) - können jeweils durch individuelle Agenden stimuliert bzw. aktiviert werden. Bei einer Infektion durch exogene Faktoren, wie Bakterien, spielen sie eine bedeutende Rolle in der Antigenerkennung und Aktivierung des innaten Immunsystems. Die am besten untersuchten TLR sind:

- TLR-2, welcher sensibel für PAMPs in Form von Zellwandbestandteilen Gram-positiver Bakterien ist (In Experimenten wird meist das synthetische Analogon P₃C zur Stimulation verwendet);

- TLR-4, welcher sensibel für LPS Gram-negativer Bakterien ist;
- TLR-9, welcher sensibel für bakterielle DNA wie bspw. CpG ist (Nguyen et al. 2002).

Für murine MG konnte nachgewiesen werden, dass sie die bisher für die Maus bekannten TLR 1-9 exprimiert und dass einer Stimulation die Expression von Chemokinen und APC-Oberflächenmolekülen folgt (Olson und Miller 2004). Die nach dem bisherigen Kenntnisstand bedeutendsten proinflammatorischen Zytokine der innatens Immunität sind der $\text{TNF}\alpha$ und das $\text{IL-1}\beta$ (Nguyen et al. 2002), wobei der $\text{TNF}\alpha$ zu einer auto- und parakrinen Stimulation seines $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor1 führt und damit zur weiteren Mikrogliazellen-Aktivierung beiträgt, und $\text{IL-1}\beta$ über die Bindung an seinen IL-1 -Rezeptor1 auf Astrozyten diese zu einer Ausschüttung von Neurotrophenen anregt.

Eine Aktivierung der MG konnte jedoch nicht nur für exogene Faktoren, sondern auch für endogene Substanzen beobachtet werden. So publizierten Meda et al. 1995, dass Mikrogliazellen durch das im Falle der AD vermehrt vorliegende Peptid $\text{A}\beta$ (Mohandas et al. 2009) ebenfalls aktiviert werden. Die Aktivierung der Mikroglia durch $\text{A}\beta$ erfolgt jedoch über verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren (Bamberger et al. 2003) und nicht, wie bei den exogenen Substanzen als PAMPs, über die TLR. Sie mündet jedoch ebenso in eine Produktion von Zytokinen, was von Mehlhorn et al. 2000 in den $\text{A}\beta$ -Plaques umgebenden Gliazellen nachgewiesen werden konnte.

Für Mikrogliazellen ist jedoch nicht nur dieser einfache Weg der Aktivierung beschrieben, es ist weiterhin auch eine erhöhte Aktivierung und Reaktivität im Rahmen eines *Priming* beschrieben. Hierunter versteht man eine verstärkte Reaktion der MG auf ein stimulierendes Agens, wenn die MG bereits mit einem Agens vorbehandelt sind, welches selbst jedoch noch keine messbare Reaktion der MG verursacht. So konnten Gifford und Lohmann-Matthes 1987 eine erhöhte Ausschüttung von $\text{TNF}\alpha$ durch Mikrogliazellen nach einer Vorbehandlung mit Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) und der Aktivierung durch LPS im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit LPS nachweisen. Eine erhöhte Ausschüttung von Zytokinen konnte auch durch das *Priming* mit Muramyl nachgewiesen werden (Parant et al. 1995).

Diese Aktivierung von Mikrogliazellen führt jedoch nicht immer zu Reaktionen, die auf die Pathogene beschränkt sind. Combs et al. konnten 1999 eine neurotoxische Reaktion von MG bei der Stimulation mit $\text{A}\beta$ -Fragmenten beobachten. 2001 konnten sie, wie bereits schon unter 1.2 erwähnt, im Zusammenhang mit $\text{A}\beta$ eine Zytokinausschüttung von MG beobachten (Combs et al. 2001). In weiteren Versuchen konnte auch bei der experimentell herbeigeführten Entzündungsreaktion durch Bakterien ein Neuronenuntergang beobachtet werden (Braun et al. 2001). Es konnte jedoch in diesem Zusammenhang nicht geklärt werden, ob dieser Neuronenschaden durch MG oder durch Bakterien verursacht wurde. In weiteren Experimenten wurden Mikrogliazellen mit TLR-Agonisten stimu-

liert, um eine toxische Wirkung von Bakterien auszuschließen, so konnten Hoffmann et al. 2007 einen durch MG verursachten Neuronenschaden bei der Mikrogliastimulation mit dem TLR-2-Agonisten P₃C nachweisen.

1.4 Klinische Verschlechterung von neurodegenerativen Erkrankungen im Rahmen von systemischen Infektionen

Wie bereits in der Einführung erwähnt, wird bei der AD häufig eine Verschlechterung und Progredienz der Symptomatik im Zusammenhang mit systemischen Infektionen beobachtet. In Beobachtungsstudien von mono- und dizygoten Zwillingen konnte dokumentiert werden, dass es im Rahmen einer Infektion, eines Traumas oder hormoneller Veränderungen bei den monozygoten Zwillingen in 59 Prozent der Fälle und bei den dizygoten Zwillingen in 40 Prozent der Fälle für den Zwilling mit einer der o.g. Prädispositionen zu einer früheren AD-Symptomatik gekommen ist (Nee und Lippa 1999). In einer weiteren Studie, welche sich mit Zwillingspaaren beschäftigte, konnte gezeigt werden, dass es neben den genetischen Faktoren auch individuelle Risikofaktoren gibt (Gatz et al. 2006).

Weiterhin konnte mehrfach gezeigt werden, dass wiederholte Traumata des ZNS als Risikofaktor für eine dementielle Entwicklung zu sehen sind. So zeigte sich bereits in mehreren Studien bei Personen mit chronisch rezidivierenden Traumata des ZNS in neuropathologischen Untersuchungen ein nahezu gleiches neuropathologisches Bild wie bei der AD oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen (Rudelli et al. 1982, McKee et al. 2009). In einer Fall-Kontroll-Studie konnte durch Dunn et al. 2005 gezeigt werden, dass sich bei alten Menschen (84. Lebensjahr und älter) das Risiko, an einer Demenz zu erkranken, durch zwei oder mehr durchgemachte Infektionen im Gegensatz zur Kontrollgruppe erhöht (Odds Ratio 1,4). In einer weiteren Studie, bei welcher 90-jährige und ältere Personen untersucht wurden, konnte ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten c-reaktiven Protein-Spiegel und dem Vorliegen einer Demenz gezeigt werden (Kravitz et al. 2009). Auch eine Auswertung der Daten der Framingham-Studie stützt die Hypothese, dass eine Infektion neurodegenerative Erkrankungen verschlechtern kann. So konnte die Auswertung der IL-1- und TNF α -Konzentration im peripheren Blut zeigen, dass bei einem erhöhten Blutspiegel dieser, im Vergleich zu einer normalen Konzentration, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer Demenz gegeben ist (Tan et al. 2007). Es konnte sogar gezeigt werden, dass bei einem Großteil der Patienten mit AD zum Todeszeitpunkt eine systemische Infektion vorlag, wohingegen bei der Kontrollgruppe ohne AD der Anteil an kardiovaskulären Erkrankungen und bösartigen Neubildungen überwog (Beard et al. 1996). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass bei Patienten

mit einer AD die Aspirationsgefahr erhöht ist und somit auch ein gehäuftes Auftreten von Aspirationspneumonien zu beobachten ist (Kalia 2003).

Diese Progredienz bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie amyotropher Lateralsklerose und Prionenerkrankungen, konnte in Tierversuchen bei experimentell herbeigeführten systemischen Infektionen bestätigt werden (Combrinck et al. 2002, Nguyen et al. 2004, Cunningham et al. 2005, Cunningham et al. 2009).

Bei der weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Progredienz der AD und inflammatorischen Vorgängen konnte eine protektive Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) gezeigt werden. In 'T Veld et al. schreiben in ihrer Publikation von 2001, dass eine Langzeiteinnahme von NSAR das Risiko, eine AD zu entwickeln, senken kann. Die Einnahme von NSAR scheint die Entzündungsreaktion zu unterdrücken und so eine Progredienz der neurodegenerativen Erkrankungen zu verhindern (Perry et al. 2003), wobei der genaue pharmakologische Wirkmechanismus noch nicht verstanden wurde (Perry et al. 2007).

1.5 Hypothese

Mikrogliazellen können durch eine gleichzeitige Stimulation mit endogenen und exogenen Substanzen einen additiven Neuronenschaden induzieren.

Wie in Punkt 1.4 ausführlich beschrieben, konnte bei Patienten im Zusammenhang mit klinischen Infektionen ein schnelleres Fortschreiten der AD beobachtet werden. Der Nachweis, dass Mikrogliazellen durch endogene Substanzen wie A β aktiviert werden können, gelang Meda et al. 1995. Für exogene Substanzen, wie den TLR4-Agonisten LPS, konnten Gifford und Lohmann-Matthes 1987 die Aktivierung von Mikrogliazellen beobachten. Sie beschrieben auch schon eine höhere TNF α -Produktion, wenn die Zellen gleichzeitig mit IFN γ stimuliert wurden. Ebert et al. konnten 2005 eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der Mikrogliaaktivierung im Zusammenhang mit den TLR-2, -4 und -9 aufzeigen. Durch Lotz et al. konnte 2005 eine additive Aktivierung von Mikroglia durch das endogene Agens A β ₁₋₄₀ in Kombination mit exogenen Agenzien in Form von TLR-2- und TLR-4-Agonisten nachgewiesen werden.

In diesem Kontext wird von den o.g. Autoren ein additiver Mikroglia-assoziiertes Neuronenschaden angenommen, welcher bei additiver Stimulation der Mikrogliazellen mit den o.g. endogenen und exogenen Substanzen durch die MG, verursacht wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, den im Zusammenhang mit der kombinierten Mikroglia-stimulation durch exogene und endogene Substanzen vermuteten, mikroglial verursachten Neuronenschaden im Mikroglia-Neuronen-Kokulturmodell (MG-N-Kokulturmodell) nachzuweisen. Im Rahmen dieser Arbeit soll dies für das bei der AD erhöhte endogene Stimulans A β ₁₋₄₀ in Kombination mit den exogenen Stimulanzien TLR-2- (P₃C) und TLR-

4-Agonist (LPS) erfolgen. Für den TLR-4-Agonisten LPS konnten Lehnardt et al. 2003 bereits eine Neuronenschädigung nachweisen, jedoch wurde die Kombination mit A β nicht untersucht.

Es soll nun eine Quantifizierung der Neuronenschäden der Einzelsubstanzen im Vergleich zu ihrer Kombination im MG-N-Kokulturmodell erfolgen, um so die neurotoxischen Eigenschaften der MG besser zu verstehen und weitere Untersuchungen anzubahnen.

Um einen nicht mikroglial verursachten Neuronenschaden auszuschließen, sollen primär murine Neuronenkulturen (N-Kulturen) auf Schädigung durch die gleichen o.g. Substanzen in Abwesenheit von Mikrogliazellen untersucht werden.

Die Quantifizierung des Neuronenschadens soll computergestützt erfolgen. Dabei sollen Parameter bestimmt und definiert werden, die konstante und objektive Ergebnisse liefern und somit nicht von leichten Veränderungen, wie z.B. der Belichtung bei der Aufnahme der Bilder, abhängig sind. Weiterhin soll diese Auswertungsmethode auch auf Folgeexperimente, bei welchen die MG-N-Kokulturen mit anderen Stimulanzen behandelt werden, angewendet werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien und Reagenzien:	
Amyloid β -Protein (1-40) hydrochloride salt	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Mouse	Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland
Aqua bidest.	Universitätsmedizin-Apotheke, Göttingen, Deutschland
Aqua dest.	Universitätsmedizin-Apotheke, Göttingen, Deutschland
B27 Supplement	GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Großbritannien
DePeX	Serva, Heidelberg, Deutschland
Diethylether	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco´s modifided Eagle´s Medium (DMEM) + GlutaMAX - I	GIBCO Paisley, Großbritannien
Ethanol 99,9%	Merck, Hamburg, Deutschland
Foetal Bovine Serum (FCS)	GIBCO Paisley, Großbritannien
Formaldehyd 37%	Merck, Hamburg, Deutschland
Interferon γ Mouse, rekombinant	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Map-2 (monoclonal mouse)	Chemicon, Billerica, USA
Mayers Hämalaun	Merck, Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Neufuchsin-Färbelösung	Merck, Hamburg, Deutschland
Neurobasalmedium (NBM)	GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Großbritannien
Pam3CSK (P ₃ C)	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (PS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Rabbit Antimouse	Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tabelle 1

Lösungen und Medien:	
4%ige Formaldehydlösung	hergestellt aus Formaldehyd 37% und PBS
70%ige Ethanollösung	hergestellt aus Ethanol 99,9% und Wasser
Lysis	9%ige Triton-X-100-Lösung in Aqua bidest
MG-Zellmedium	DMEM + 10%FCS + 100U/ml Penicillin + 100µg/ml Streptomycin
N-Zellmedium	Neurobasalmedium + Supplement B27 + Glutamat
PBS	zum Gebrauch zu 9,55g je Liter entmineralisiertem Wasser gelöst
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tris-buffered Saline (TBS)	Hergestellt aus 50mM Tris + 150mM NaCl

Tabelle 2

Geräte:	
Autoklav	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Binokular	Carl-Zeiss, Deutschland
Inkubator - Heraeus Instruments 6000	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop	Olympus Optical CoLtd - IMT-2
Mikroskop BX51TF	Olympus, Hamburg, Deutschland
Neubauerzählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim, Deutschland
Pinzette, chirurgisch BD 537	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Präparationsschere BC61	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Präzisionspinzette	A. Dumont & Fils, Schweiz
Schüttelplatte	Bioblock Scientific, Frenkendorf, Schweiz
Sterilhaube - Heraeus Instruments Lamin Air HV 2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortex	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge - Jouan CIR 422	Jouan, Frankreich

Tabelle 3

Software:	
AnalySIS	Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland
Definiens Developer XD Version 1.0.0	Definiens AG, München, Deutschland
GraphPad Prism 4.0.	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Excel für Mac Version 12.2.4.	Microsoft Cooperation, Santa Rosa, California, USA

Tabelle 4

Verbrauchsmaterialien:	
1-ml-, 10-ml- und 20-ml-Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
15-ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24-Well-Platte	Costar Corning Inc., Amsterdam, Niederlande
50-ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Becher	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Coverslips	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
E-Cups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Parafilm	Pechiney, plastic packing, Chicago, USA
Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkultur-Flaschen	Costar Corning Inc., Amsterdam, Niederlande

Tabelle 5

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

2.2.1.1 Primäre murine Mikroglia-Kultur

Die benötigten Murinae wurden von der Tierzucht des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin oder der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen bezogen.

Zur Anlage der mikroglialen Zellkulturen wurden neugeborene, bis zu drei Tage alte Murinae C57/BL6 durch Dekapitation getötet. Danach erfolgte die Sprüh-Desinfektion des Kopfes mit 70%iger Ethanol-Lösung. Direkt im Anschluss wurden die Gehirne der Murinae mit zwei Pinzetten freipräpariert und in PBS auf Eis gelagert. Von den Gehirnen wurden in PBS-Lösung unter dem Binokular die Meningen entfernt. Nach der vollständigen Entfernung der Meningen wurden die Gehirne in PBS-Lösung mit einer 1000- μ l-Pipette homogenisiert und für 10 Minuten bei 250g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt. Das Zellsediment wurde mit 0,5ml MG-Zellmedium je Gehirn aufpipettiert und je 2 Gehirne in die bereits mit 11ml Zellmedium befüllten Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Mikroglia-Zellkulturen wurden nun für zwei Wochen bei 37°C und 5% (v/v) CO₂-Begasung inkubiert. Hierbei bildete sich ein dichter Astrozytenrasen, auf welchem sich die Mikrogliazellen entwickelten. Das Medium wurde nach jeweils fünf Tagen gewechselt.

Die Gewinnung der Mikroglia erfolgte ca. alle 10 Tage, indem die Zellkulturflaschen für ca. 30 Minuten auf eine Schüttelplatte (50x/Minute) gestellt wurden. Danach wurde das Medium abpipettiert und für 10 Minuten bei 250g und 20°C zentrifugiert. Den Zellkultur-

flaschen wurde direkt im Anschluss wieder 12ml Zellmedium zugegeben und sie wurden weiter inkubiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand größtenteils vorsichtig entfernt. Das Sediment wurde in dem verbliebenen Überstand gelöst. Der Zellsuspension wurden 10µl entnommen und in 90µl Trypanblau überführt. Diese Lösung wurde zur Auszählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer verwendet.

Für die Anlage einer Mikroglia-Neuronen-Kokultur wurde eine Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Mikrogliazellen/ml in Neuronen-Zellmedium hergestellt.

2.2.1.2 Primäre murine Neuronen-Kultur

Die benötigten Murinae C57/BL6 wurden von der Tierzucht des Max-Planck-Instituts für experimentelle Medizin oder der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen bezogen.

Zur Vorbereitung wurden in die äußeren 8 Well von 24-Well-Platten sterilisierte Coverslips mit einem Durchmesser von 13mm gelegt. Diese Wells wurden je mit 400µl Poly-L-Lysin (PLL) befüllt und für mindestens 2 Stunden bei 37°C und 5% (v/v) CO₂-Begasung inkubiert.

Für die Anlage von Neuronen-Kulturen (N-Kulturen) wurden Embryonen (E16, C57/BL6) benötigt. Diese wurden graviden Murinae (C57/BL6) nach der Tötung durch einen Genickbruch unter CO₂-Narkose durch einen Bauchschnitt entnommen. Die Embryonen wurden von den Eihäuten befreit und in PBS auf Eis gelagert. Unter dem Binokular wurden die Gehirne der Embryonen in PBS-Lösung frei präpariert und die Meningen entfernt. Die Gehirne wurden in 10ml Trypsin gegeben und für 10 Minuten im 37°C Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Trypsin abpipettiert und das Röhrchen mit 10ml DMEM + 10%FCS-Medium befüllt, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Nun wurden die Gehirne mit einer 1000-µl-Pipette homogenisiert und für fünf Minuten bei 1000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abpipettiert und 10ml N-Zellmedium zugegeben. Von dieser Zellsuspension wurden 10µl entnommen und 90µl Trypanblau zugesetzt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde nun die Zellzahl bestimmt. Nach der Auszählung wurde eine Konzentration von $5,5 \times 10^5$ Zellen/ml mit N-Zellmedium hergestellt. Nach der Entfernung des PLL wurde die Zellsuspension nun zu 500µl/Well in den äußeren Ring der vorbereiteten 24-Well-Platten überführt. Nach der Aussaat wurden die 24-Well-Platten bei 37°C und 5% (v/v) CO₂-Begasung inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte ein Mediumwechsel. Eine Stimulation oder die Anlage einer Mikroglia-Neuronen-Kokultur konnte nach fünf Tagen erfolgen.

2.2.1.3 Primäre murine Mikroglia-Neuronen-Kokultur (MG-N-Kokultur)

Am fünften Tag nach der Anlage der N-Kultur wurde eine Mikroglia-Zellsuspension mit einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml in N-Zellmedium, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, hergestellt. Das Verhältnis zwischen Neuronen und Mikroglia sollte somit bei 2:1 liegen. Von dieser MG-Suspension wurden jeweils 500µl bei einem Mediumwechsel jedem Well der Neuronenkulturen zugegeben. Eine Stimulation erfolgte jeweils nach einer Inkubation von 24 Stunden, bei 37°C und 5% (v/v) CO₂-Begasung.

2.2.1.4 Stimulation der murinen MG-N-Kokultur

Die Stimulation der Zellkulturen erfolgte im Rahmen eines Mediumwechsels nach 24 Stunden der Anlage der Kokulturen. Hier wurde das Stimulans in der gewünschten Konzentration im N-Zellmedium gelöst, welches bereits zusätzlich IFN γ (100U/ml) enthielt und anschließend zu je 500µl auf die MG-N-Kokulturen aufgebracht wurde.

2.2.1.5 Beendigung der Stimulation der murinen MG-N-Kokultur

Die Beendigung der Stimulation erfolgte nach 72 Stunden. Hier wurde das Medium abpipettiert und in E-Cups überführt. Die Coverslips mit den darauf befindlichen Zellkulturen verblieben vorerst in den 24-Well-Platten und wurden zur Fixation bis zur Färbung mit 4%iger Formaldehydlösung bedeckt. Die Überstände wurden in den E-Cups bei -20°C eingefroren.

2.2.1.6 Färbung mit Map-2 und Hämalau

Zur Durchführung der Färbung wurde die 4%ige Formalinlösung aus den 24-Well-Platten abpipettiert und die Zellkulturen durch einen dreimaligen Pufferwechsel mit Tris-gepufferter 0,9%iger Kochsalzlösung (TBS) gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellkulturen für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einer 0,1% Triton-Lösung in TBS inkubiert. Hierauf erfolgte erneut ein dreifacher Pufferwechsel mit TBS.

Nach dem erneuten Waschen wurden die Zellkulturen nun in einer 10%igen Foetal Bovine Serum-Lösung (FCS), ebenfalls in TBS verdünnt, für 30 Minuten bei RT inkubiert. Dann wurden die Coverslips aus den 24-Well-Platten entnommen und auf Parafilm für 90 Minuten bei RT mit dem Map-2-Antikörper inkubiert. Der Map-2-Antikörper wurde zuvor 1:100 in TBS verdünnt und zu je 50µl auf die Coverslips aufgetragen.

Im Anschluss erfolgte wieder eine dreimalige Spülung mit TBS, nach welcher die Coverslips für 60 Minuten bei RT mit dem Rabbit Anti-Mouse in einer Verdünnung von 1:50 in TBS inkubiert wurden.

Danach wurden die Coverslips wieder dreimal mit TBS gewaschen. Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) Mouse für 60 Minuten bei RT in einer Verdünnung von 1:50 in TBS.

Nun konnte die Farbentwicklung mit Neufuchsin-Färbelösung nach Herstelleranleitung erfolgen.

Anschließend wurden die Coverslips mit Aqua dest. gespült und die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun wie folgt durchgeführt: Mayers Hämalaun wurde 1:2 mit Aqua bidest verdünnt und anschließend die Coverslips für 30 Sekunden damit benetzt. Hiernach erfolgte für 10 Minuten das Bläuen in Leitungswasser. Nachdem die Coverslips nun für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet wurden, konnten sie auf einem Objektträger mit DePeX eingedeckelt werden.

2.2.1.7 Fotoaufnahmen der Kokulturen

Die Coverslips mit den gefärbten Kokulturen wurden mit einer Schablone abgedeckt, so dass nur an vier definierten Stellen auf dem Coverslip die Aufnahme eines Fotos möglich war. Auf diese Weise wurden mit Hilfe der AnalySIS-Software und dem angeschlossenen Olympus-Mikroskop vier planimetrische digitale Aufnahmen mit einer 200-fachen Vergrößerung eines jeden Coverslips erstellt und im TIF-Format gespeichert.

2.2.2 Computergestützte Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem eigens in der Cognition Network Language der Software Definiens Developer XD Version 1.0.0. entwickelten Auswertungsalgorithmus, *ruleset* genannt. Dieses basiert auf der Definiens Cognition Network Technology®. Hierbei handelt es sich um eine Software zur objektorientierten Bildanalyse, die nach dem Client-Server-Modell arbeitet (Definiens 2010). Der große Vorteil dieser Software ist die Möglichkeit, nach der Entwicklung eines Auswertungsalgorithmus, auf den im Folgenden noch genauer eingegangen wird, diesen auf alle Bilder anwenden zu lassen. Hierfür kann man mit der Software alle Bilder auf dem Server speichern und mit Hilfe eines *Workspace* den Auswertungsalgorithmus auf alle gewünschten Bilder anwenden lassen. Die Software wendet diesen zwar auf jedes Bild an, legt die Ergebnisse zur weiteren Auswertung aber alle in einer Datei ab.

Die o.g. Software der Firma Definiens ist eine Software zur objektorientierten Bildanalyse, die bestimmte Werkzeuge zur Zusammenfassung von Bildelementen bereitstellt. Eine grundlegende Funktion der Software ist die Segmentierung der Bilder. Diese ist eine der Grundvoraussetzungen für die weitere objektorientierte Bildanalyse. Bei der Segmentierung handelt es sich um ein Teilgebiet der Informatik, welche sich mit der Zusammenfassung von Bildelementen aufgrund ihrer Nachbarschaftsbeziehungen und Wertähnlichkeit beschäftigt. Es gibt drei Grundverfahren der Segmentierung, die punkt-, die regionen- und die kantenorientierte Segmentierung. Die Software - Definiens Developer XD Version 1.0.0. - bietet die Möglichkeit einer multiskaligen Segmentierung (engl.:

multiresolution segmentation), welche auf der regionenorientierten Segmentierung basiert. Unter der regionenorientierten Segmentierung versteht man, dass von einem Segment A aus ein Segment B gesucht wird, das das Homogenitätskriterium am besten erfüllt. Danach wird vom Segment B ausgehend ein Segment C auf die gleiche Weise gesucht. Wird ein Segment C gefunden, wird dieses auch mit dem Segment A verglichen. Nur wenn es auch zu Segment A passt, werden diese verschmolzen. Falls es nicht passt, wird Segment B zu Segment A. Auf diese Art wird die gesamte Region untersucht und verglichen. Bei der *multiresolution segmentation* werden mehrere Homogenitätskriterien angeboten, so kann der Benutzer eine Mischung aus den Faktoren Form und Farbe festlegen und kann dieses Verhältnis nach dem „try-and-error“-Prinzip an seine Bedürfnisse anpassen. Bei der Form kann der Benutzer noch weitere Einstellungen gewichten, so wird der Kreis in der Segmentierung als Idealform angesehen, eine Abweichung von dieser Form kann durch die Einstellung des Verhältnisses von kompakten Objekten (Einstellung in der Software: *compactness*) und gestreckten Objekten (Einstellung in der Software: *smoothness*) erfolgen. Weiterhin kann eine Gewichtung im spektralen Bereich, im Rot-Grün-Blau-Farbraum, erfolgen und eine Einstellung zur Größe der Zielsegmente (Einstellung in der Software: *scale*) gewählt werden (Tomowski et al. 2006).

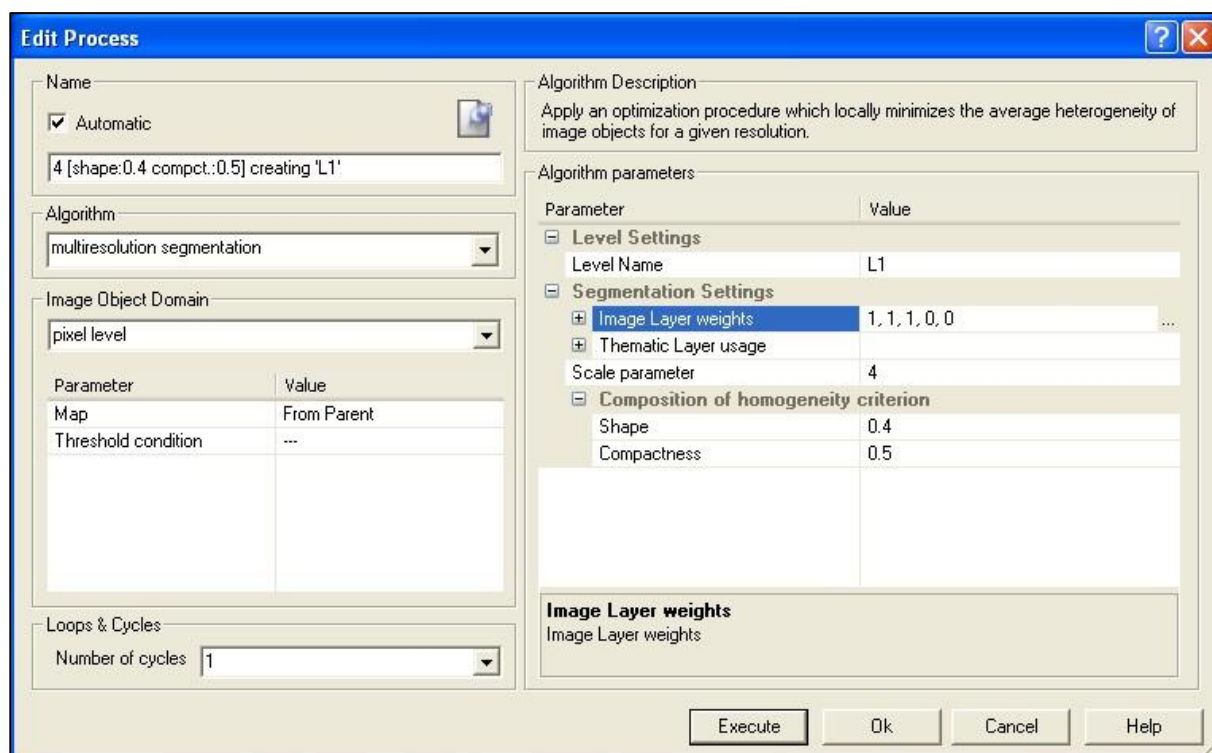


Abbildung 1 Screenshot mit der Einstellung der *multiresolution segmentation* im entwickelten ruleset des Definiens Developer XD Version 1.0.0.

So können initial von der Pixelebene ausgehend mehrfach Segmente erzeugt werden, die sich nach den o.g. Kriterien unterscheiden und in einem hierarchischen System zueinander stehen (Tomowski et al. 2006), wie in Abbildung 2 ersichtlich.

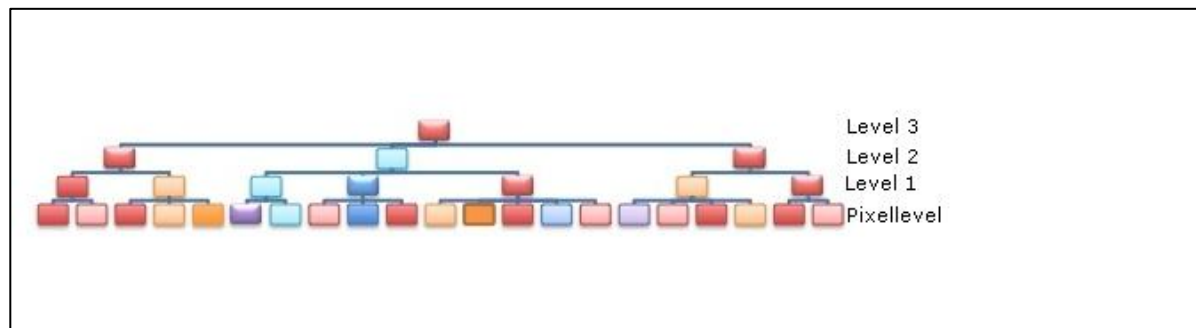


Abbildung 2 Darstellung der hierarchischen Beziehung von Objekten in Anlehnung an Abb. 3.11 aus Tomowski et al. 2006

Für die Auswertung der MG-N-Kokultur wurde die *multiresolution segmentation* mit der Einstellung, die in der Abbildung 1 ersichtlich ist, verwendet. Die so erzeugten Segmente konnten nun mit Hilfe der gegebenen Werkzeuge zu *region of interest* definiert und klassifiziert werden. Im ersten Schritt der Klassifikation wurden die Zellkerne mit Hilfe der „*watershed*“-Funktion definiert. Hierbei kann man sich vorstellen, dass aus den Grauwerten des Bildes eine Art Geländemodell erstellt wird, in welchem jedes Pixel einen Höhenwert repräsentiert. In der klassischen „*watershed*“-Funktion werden die Gipfel durch die hellen Grauwerte gebildet, die dunkleren Grauwerte repräsentieren die Täler (Vincent und Soille 1991). Nun werden bei der „*watershed*“-Funktion die Täler geflutet, bis nur noch die Gipfel sichtbar sind. Diese Funktion kann man jedoch auch kontrolliert durch gesetzte Marker ausführen, welche die Höhe der Flutung einstellen, so dass in diesem Fall die stärksten Grauwerte, d.h. die mit Hämalan gefärbten Zellkernsegmente, erkannt werden. Nachdem nur noch die dunklen Zellkernsegmente sichtbar sind, werden diese zusammenliegenden Segmente als jeweils ein Zellkern zusammengefasst (siehe Abbildung 3).

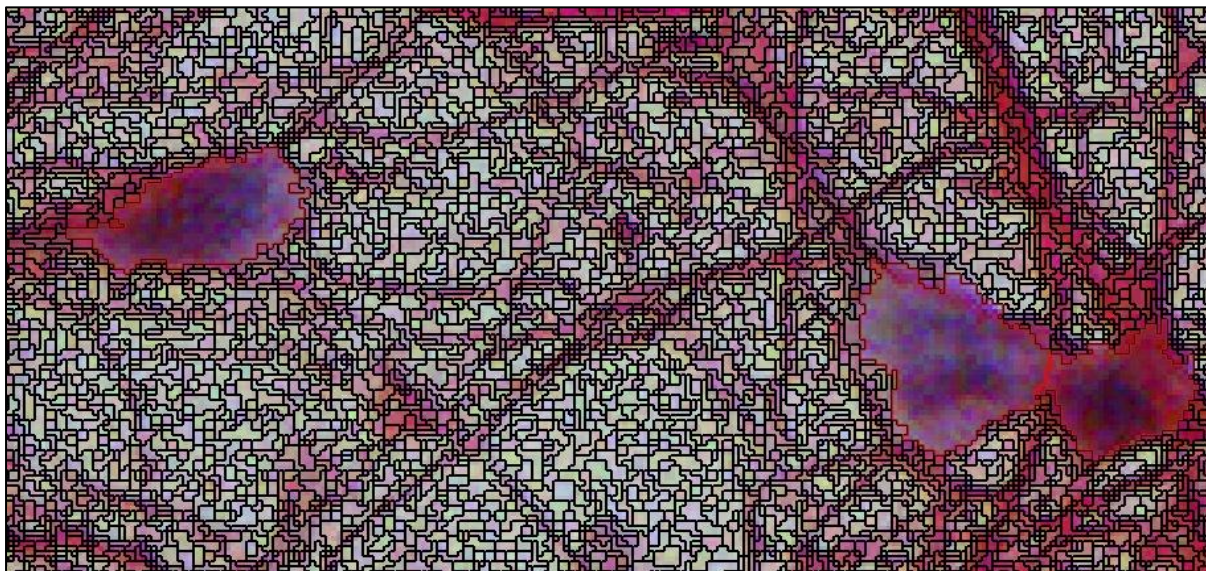


Abbildung 3 Screenshot im Ablauf des entwickelten *ruleset* nach der abgelaufenen *multiresolution segmentation*, durchlaufener „*watershed*“-Funktion, Klassifikation und Zusammenlegung der Kernsegmente. In der Abbildung sind bis auf die erkennbaren großen Zellkerne die noch unveränderten Segmente zu erkennen. Zum Vergleich sind in der Abbildung 7 die Segmente der Kerne noch nicht klassifiziert und zusammengefasst.

Im nächsten Schritt wurden die Nervenzellausläufer, da eine Unterscheidung zwischen Dendriten und Axonen optisch nicht eindeutig möglich war, über die „*Mean Difference to Neighbours*“-Funktion gemeinsam als „Axon“ klassifiziert. Hierbei wurden die bisher unklassifizierten Segmente, die eine gemeinsame Grenze haben, über deren Länge gewichtet und klassifiziert. Hatten sie keine gemeinsame Begrenzung, wurden sie über die Fläche der Nachbarobjekte gewichtet (Definiens 2009). Nach der Klassifikation der Nervenzellausläufer (siehe Abbildung 4) wurden diese noch über die Anzahl ihrer „Axon“-Nachbarsegmente subklassifiziert.

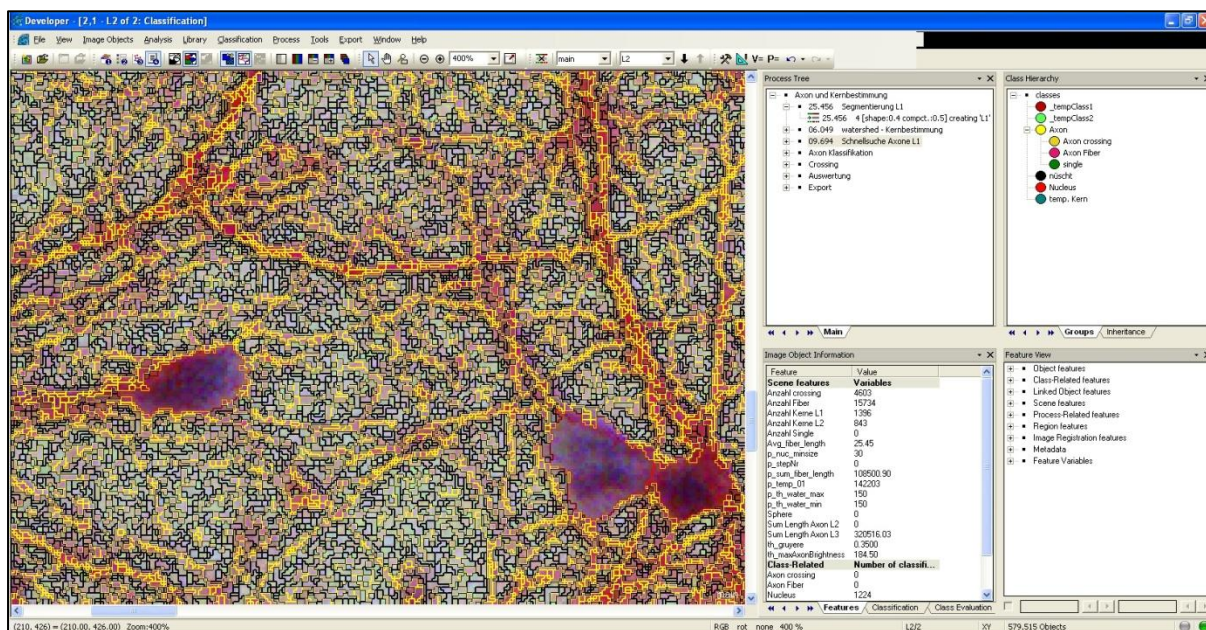


Abbildung 4 Screenshot im Ablauf des *ruleset*. An dieser Stelle sind im linken Teil des Bildes die bereits klassifizierten Zellkerne (bläulich) und die klassifizierten „Axon“ (gelb) erkennbar, wobei die „Axon“ noch nicht subklassifiziert wurden. Im rechten Teil des Bildes ist die Bedienungsfläche mit einem Teil der Einstellungen des *ruleset* der Definiens Developer XD 1.0.0. Software abgebildet.

So wurden einzelne „Axon“-Segmente ohne direkte Nachbarschaft zu weiteren „Axon“-Segmenten als „*single*“ klassifiziert. „Axon“-Segmente mit ein oder zwei benachbarten „Axon“-Segmenten wurden als „*fibre*“ definiert und mit diesen verschmolzen, so lange bis sie in ihrer größtmöglichen Verbindung zwei Nachbarsegmente hatten. „Axon“-Segmente mit drei und mehr „Axon“-Nachbarsegmenten wurden als „*crossing*“ definiert. Lagen mehrere solcher „*crossing*“-Segmente zusammen, wurden diese so lange verschmolzen, bis nur noch ein „*crossing*“-Segment von „*fibre*“-Axonsegmenten umgeben war (siehe Abbildung 5).

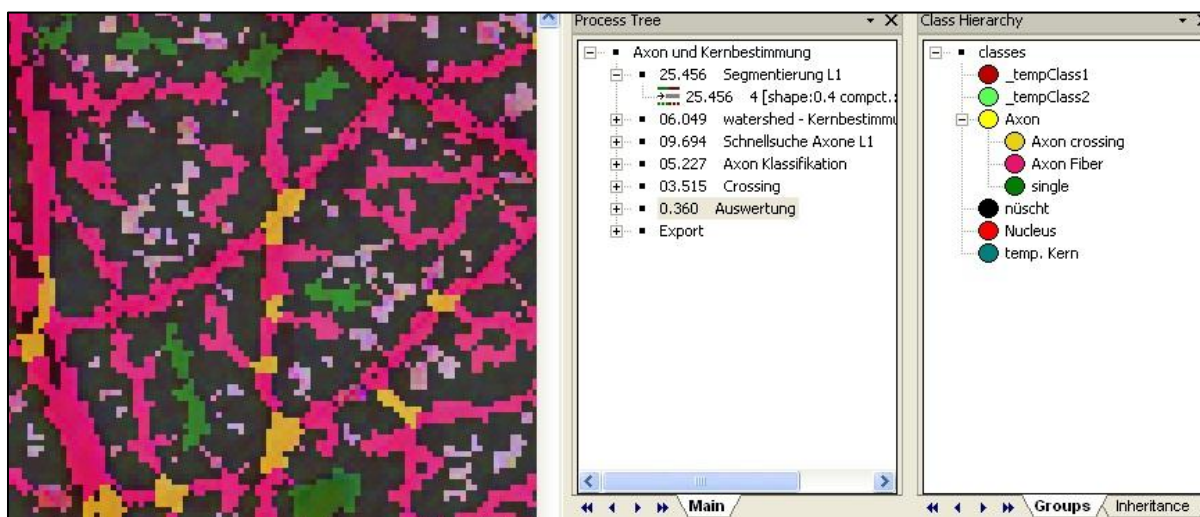


Abbildung 5 Ausschnitt eines Screenshot im Ablauf des *ruleset* der Definiens Developer XD 1.0.0. Software nach der Subklassifikation der Axonsegmente. Die farbliche Zuordnung der Klassen sowie das *ruleset* sind im rechten Bildabschnitt erkennbar. Im linken Bildteil sieht man das originale Bild mit der farblichen Überlagerung der Axonsubklassen.

Nach dem Abschluss der Klassifikation wurde die Anzahl der Zellkerne „*single*“, „*fibre*“ und „*crossing*“ sowie die Gesamtlänge der Axone („*sum length axon*“) pro Bild in eine Exceltabelle je Experiment exportiert.

2.2.3 Statistik und Darstellung

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme GraphPad Prism 4.0. und Microsoft Excel verwendet.

Zuerst wurden die jeweiligen vier Werte der Bilder eines Coverslips in der Exceltabelle über die Ermittlung des Mittelwertes wieder zu einem Ergebnis pro Coverslip zusammengefasst, was somit einem Messwert je Coverslip entspricht. Da Experimentergebnisse jedoch nicht für jedes Einzelexperiment gezeigt werden, wurden aus Gründen der Übersicht die Experimente gepoolt. Hierfür wurde der Mittelwert eines jeden Coverslip zu einer Gruppe mit seiner entsprechenden Stimulans zugeordnet. Zur weiteren Datenbearbeitung wurden jedoch nicht die absoluten Werte der im Auswertungsalgorithmus erlangten Er-

gebnisse bearbeitet, sondern diese in relative Prozentwerte zur Kontrollgruppe umgewandelt. Dafür wurde für die Kontrollgruppe jedes Experimentes der Mittelwert gebildet und als 100%-Wert angenommen. Mit diesem Wert wurden nun die absoluten Ergebniswerte für jeden Einzelwert jeder Gruppe, auch in der Kontrollgruppe, in Prozentwerte umgerechnet. Hiernach wurden die einzelnen Experimentergebnisse, je nach Stimulans, zusammengefasst.

Diese Werte wurden in das Statistikprogramm GraphPad Prism4.0 importiert. Mit Hilfe dieses Programms erfolgte die Auswertung der parametrischen Daten durch die Durchführung eines ANOVA-Tests, mit Korrektur des p-Wertes für wiederholtes Testen mittels Bonferroni-Methode. Die graphische Darstellung erfolgte in Säulendiagrammen als Mittelwert mit Standardabweichung (\pm).

Da eine Darstellung aller Gruppen in einem Diagramm jedoch zu unübersichtlich ist, werden sie in kleineren Einheiten nach Stimulansgruppen sortiert dargestellt. Die unter 3. gezeigten Ergebnisse mit Standardabweichung und p-Wert wurden einer Gesamtauswertung mit adäquater Korrektur für wiederholtes Testen entnommen.

3. Ergebnisse

3.1 Vorüberlegungen und Probleme der Quantifizierung des Neuronenschadens

In einem ersten Versuch, den Neuronenschaden in MG-N-Kokulturen zu quantifizieren, wurde versucht, die Neuronenspezifische Enolase (NSE) im Überstand der Zellkulturen zu bestimmen. Hierfür wurde ein Messverfahren zur Bestimmung der humanen NSE verwendet, deshalb kam es aufgrund einer mangelhaften Kreuzreagibilität zur murinen NSE nur zu Ergebniswerten, die in der Nähe und unterhalb des unteren Grenzbereichs der Bestimmbarkeit lagen. Die so erzielten Ergebnisse ließen sich somit aufgrund ihrer Inkonsistenz nicht für eine Quantifizierung des Neuronenschadens für diese Versuchsanordnung verwenden.

Ein weiterer Versuch, den Neuronenschaden zu quantifizieren, erfolgte über die spektrale Aufspaltung der Bilddaten. Hierbei wurde versucht, mittels der Software WCIF Image J die Neuronen aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften aus dem Bild zu extrahieren und ihre prozentuale Fläche am Gesamtbild zu bestimmen. Die Neuronen in den MG-N-Kokulturen wurden hierzu zuvor ebenfalls mit Map-2 oder versuchsweise mit β -Tubulin angefärbt. Die Methode zeigte sich dadurch sehr störanfällig, so dass schon bei kleinsten Abweichungen in der Belichtung oder Färbung eine Anpassung der Einstellungen für jedes Bild erfolgen musste. Allein durch die Bearbeitung der einzelnen Bilder war diese Methode für die Vielzahl der Bilder zu zeitaufwendig, nicht praktikabel und durch die Einzelauswertung zudem nicht objektiv. Es konnten so keine konstanten und vergleichbaren Ergebnisse erzielt werden.

Die Quantifizierung des Neuronenschadens stellte sich somit als so schwierig dar, dass nach einer Software zur objektorientierten Bildanalyse gesucht wurde, die die Option bietet, selbst einen Auswertungsalgorithmus zu entwickeln und somit eigene Bildobjekte zu definieren. Nach einigen Testversuchen stellte sich der Definiens Developer XD Version 1.0.0. als die am besten geeignete Software dar. Vor der Programmierung des Auswertungsalgorithmus (siehe Abbildung 6) erfolgten Überlegungen zur Neuronenschadenquantifizierung, aufgrund derer die Auswertungsparameter definiert und programmiert wurden. Zum einen sollte eine Klassifikation der Zellkerne als optisch hervorstechende Struktur in den MG-N-Kokulturen erfolgen. Zum anderen mussten in einem weiteren Schritt die Neuronen klassifiziert werden, die anschließend zur Ermittlung der Schädigung weiter subklassifiziert wurden.

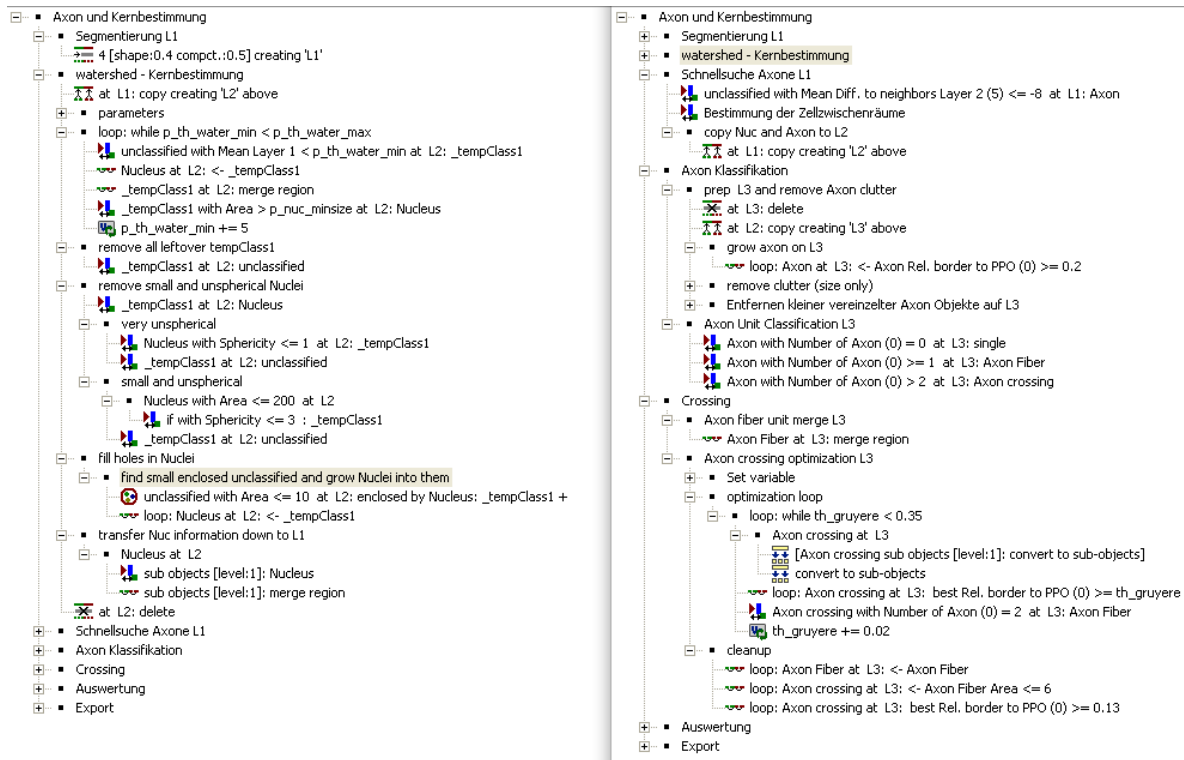


Abbildung 6 Das entwickelte ruleset. Aus Gründen der Darstellbarkeit sind nicht alle Menüfelder in einem Bild geöffnet, die Darstellung erfolgt nach ihrem Ablauf im ruleset. Die Menüpunkte der multiresolution segmentation und Kerndefinierung sind im linken Bildabschnitt geöffnet, die Zellausläuferdefinition und Subklassifizierung sind im rechten Bildabschnitt ersichtlich.

Die Klassifikation der Zellkerne erfolgte wie unter dem Punkt 2.2.2 (Seite 14) beschrieben, allerdings war die gewählte Färbung der MG-N-Kokulturen nicht spezifisch für die Zellkerne der Neuronen, so dass die Anzahl der Zellkerne als Marker der Neuronenschädigung hier nicht verwendbar ist.

Die Nervenzellausläufer wurden ebenfalls wie unter 2.2.2 (Seite 14) beschrieben als „Axon“ klassifiziert. In die Definition der Subklassen als Schädigungsmarker flossen die folgenden Überlegungen ein. Bei der Schädigung bzw. Zerstörung von Neuronen liegen diese als Bruchstücke vor, und je höher der Grad der Schädigung ist, umso höher ist die Anzahl der Bruchstücke. Diese Bruchstücke wurden als „*single*“ bezeichnet. Bei der Auswertung stellte sich das Problem, dass sich aufgrund der hohen Vergrößerung in den Zellzwischenräumen auch bei nicht geschädigten Zellkulturen immer Areale bzw. Material mit einer leichten Färbung zeigte (siehe Abbildung 7 – grüner Rahmen).

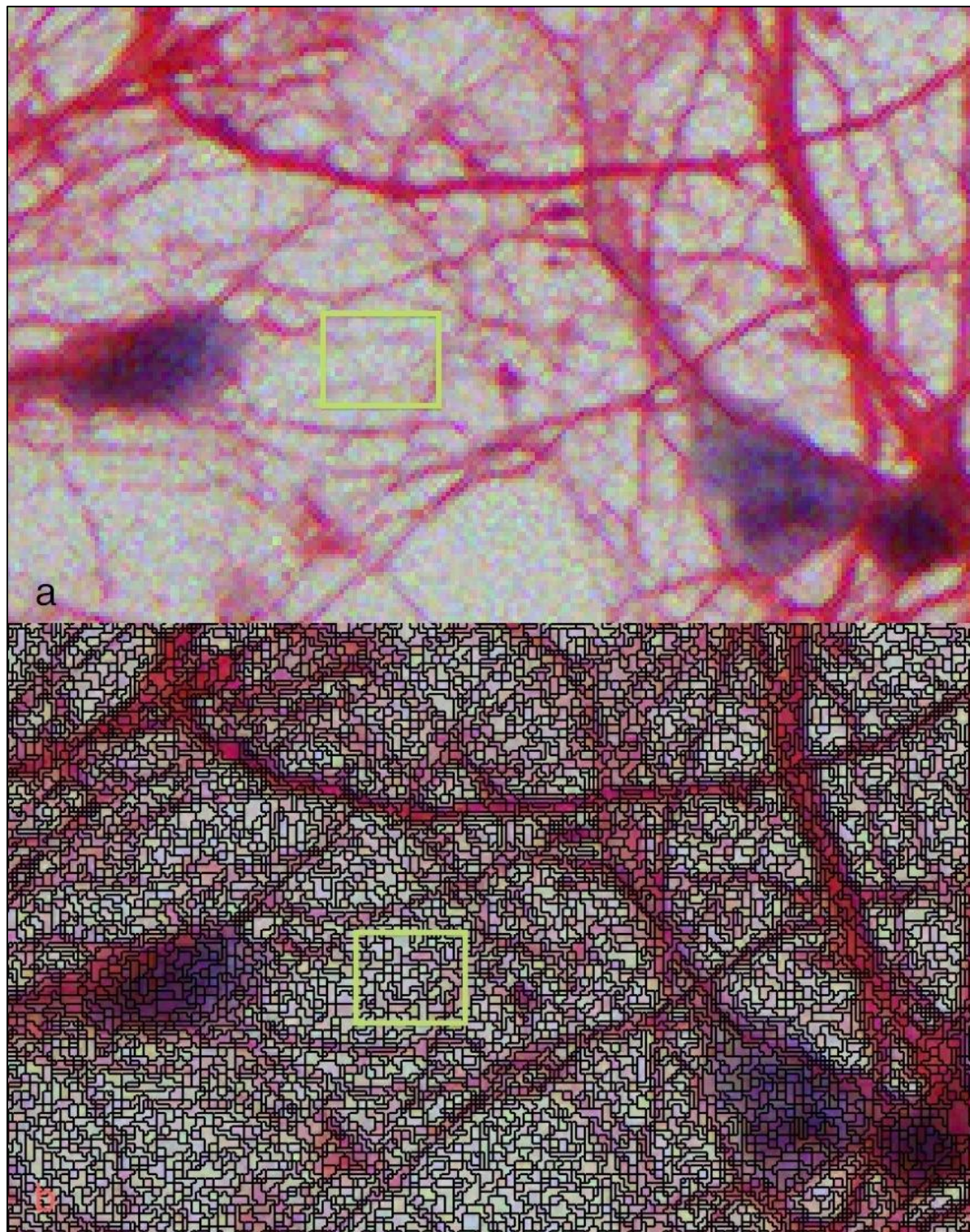


Abbildung 7 Screenshot im Ablauf des *ruleset*. Im Bildteil a ist die originale Aufnahme sichtbar. Im Bildabschnitt b ist nur die *multiresolution segmentation* des *ruleset* abgelaufen. Eine Klassifikation von Objekten hat zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden. Im eingerahmten Bildabschnitt lassen sich die Segmente mit einer stärkeren Färbung erkennen. Diese Segmente stellen ein Problem bei der Klassifikation der Axonsubklasse „*single*“ dar. Auf Grund der hohen Vergrößerung (200-fach, und hier noch einmal mit 400% Zoom des Originalbildes) lässt sich nur eine spekulative Aussage über die Ursache der Verfärbung treffen. Es könnte sich sowohl um Zellfragmente, als auch um Pixelfehler im Rahmen der digitalen Bildaufnahme handeln.

Diese gefärbten Areale nahmen eine so große Zahl ein, dass sich die „*single*“ in der Auswertung nicht als aussagekräftig erwiesen. Als ein weiterer möglicher Marker wurden die intakten Abschnitte der Nervenzellausläufer gesehen, da die Anzahl dieser mit dem Grad der Schädigung abnimmt. Sie sind aufgrund ihrer Größe und Anzahl auch deutlich besser im Bild zu identifizieren, was bei der Auswertung zu stabileren Werten führte. Die optisch intakten Nervenzellausläufer wurden zu der Subklasse „*fibre*“ zusammengefasst. Als intakt wurden hierbei „*Axon*“-Segmente angesehen, die Kontakt zu ein bis zwei „*Axon*“-Segmenten haben, ohne sich mit ihnen zu überkreuzen. Ein weiterer optisch deutlicher Marker war die Anzahl der Stellen, an denen sich die Nervenzellausläufer überkreuzten. Wir gingen davon aus, dass bei einer leichteren Schädigung nicht sofort das ganze Axon bzw. alle Nervenzellausläufer zerstört werden, sondern sich dieses initial nur verändert, z.B. verkürzt. Damit würde die Anzahl der Überquerungen schon bei einer leichten Schädigung abnehmen, was somit ein sensibler Marker für eine Schädigung wäre. Diese Überquerungen wurden als „*crossing*“ definiert. Diese „*crossing*“ zeigten in der Auswertung stabile Werte und eigneten sich somit für die Quantifizierung. Als ein weiterer möglicher Marker bot es sich an, die Gesamtlänge der Neuronenzellausläufer in Anlehnung an die unter 3.1 (Seite 20) versuchte Flächenbestimmung der Neurone zu bestimmen. Da bei der Digitalisierung der Bilder kein sicherer Längenmaßstab in die Bild-daten eingefügt werden konnte, stellte sich dieser Parameter „*sum length axon*“ als unbrauchbar dar.

Die ANOVA zeigte sich für die „*crossing*“- und „*fibre*“-Gruppen mit $p < 0,0001$ signifikant. Somit wurden für die Auswertung der Nervenzellveränderung die Anzahl der Überquerungen = „*crossing*“ und die Anzahl der Nervenzellausläufer = „*fibre*“ angesehen. Es werden daher nur diese beiden Parameter bei der Ergebnispräsentation verwendet und wie unter 2.2.3 (Seite 18) beschrieben präsentiert.

3.2 Stimulation der MG-N-Kokultur mit der endogenen Substanz A β , den exogenen Substanzen P₃C und LPS und deren Kombination

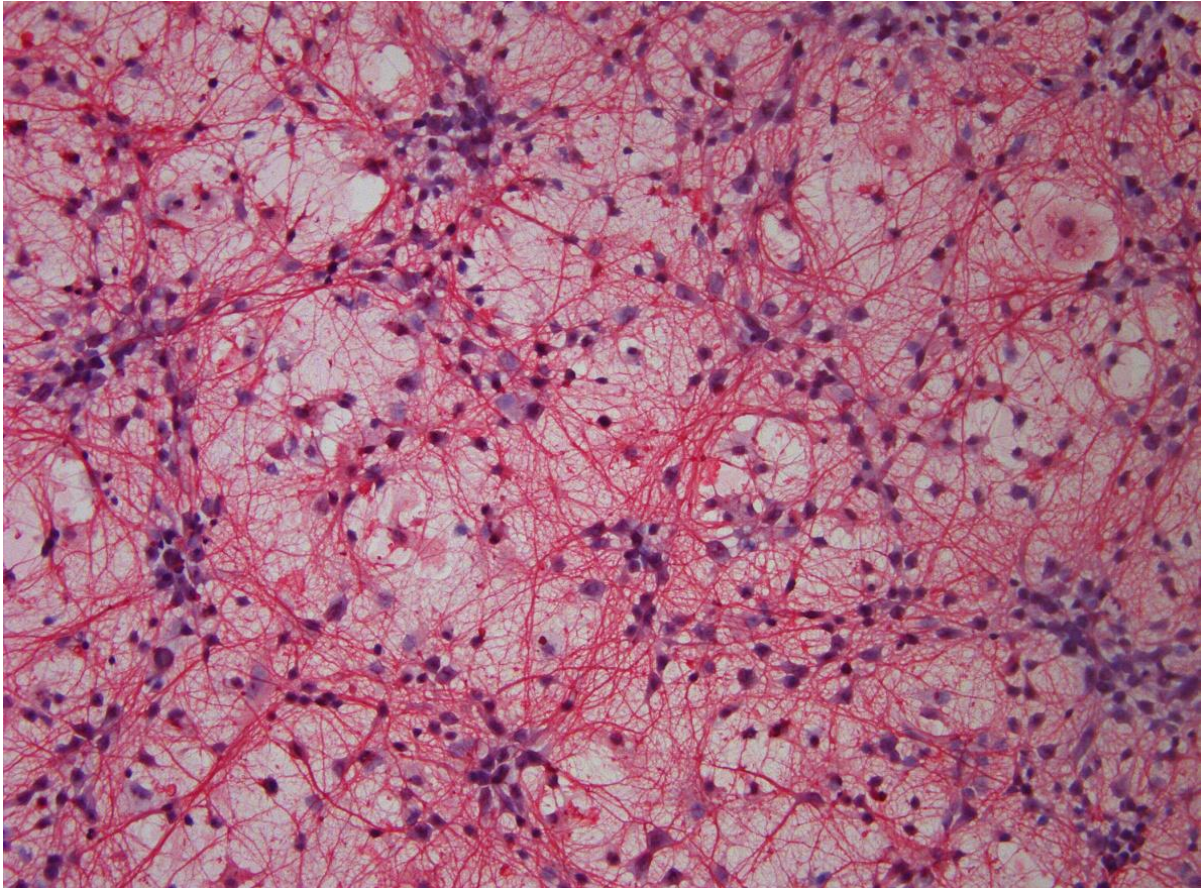


Abbildung 8 MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe nach 72h (ungeschädigt), gezeigt zur Veranschaulichung und zum Vergleich des Neuronenschadens, gefärbt mit Map-2 (Neurone – rot) und Hämalaun (Neuronen- und Mikrogliazellkerne - blau), 200-fache Vergrößerung

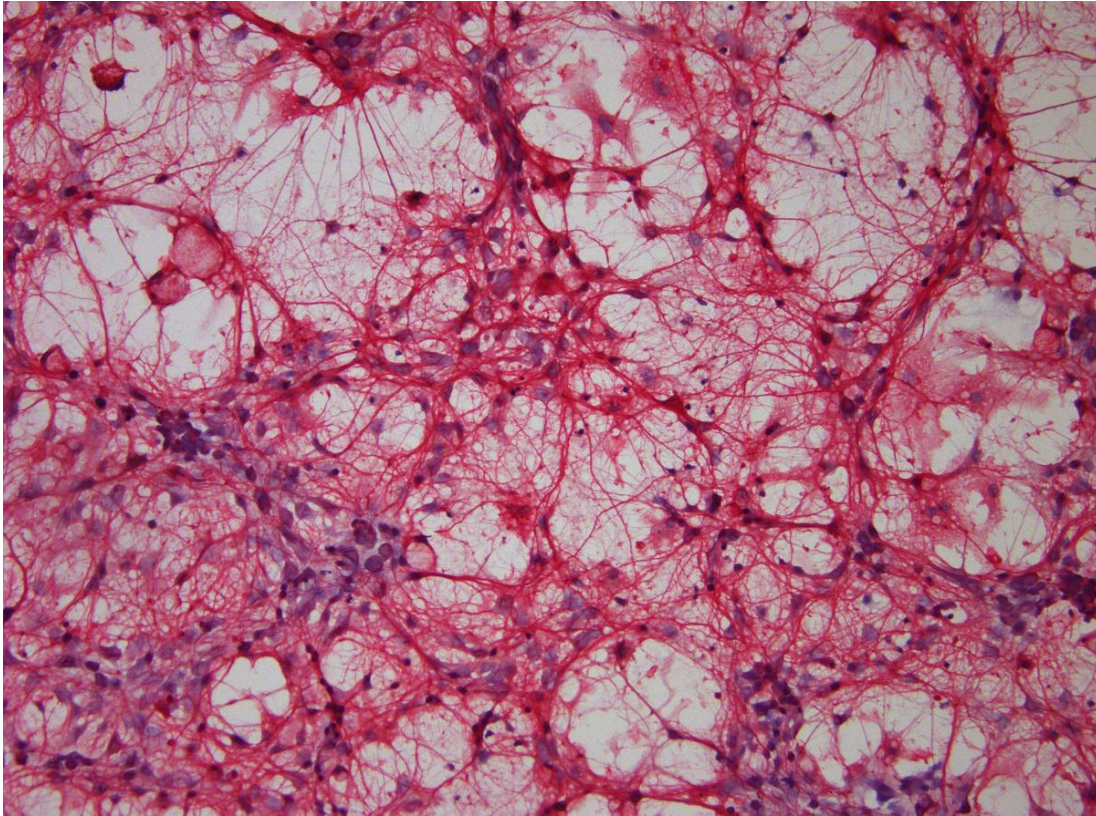


Abbildung 9 MG-N-Kokultur der A β -Gruppe nach 72h, in Abbildung 8 zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur

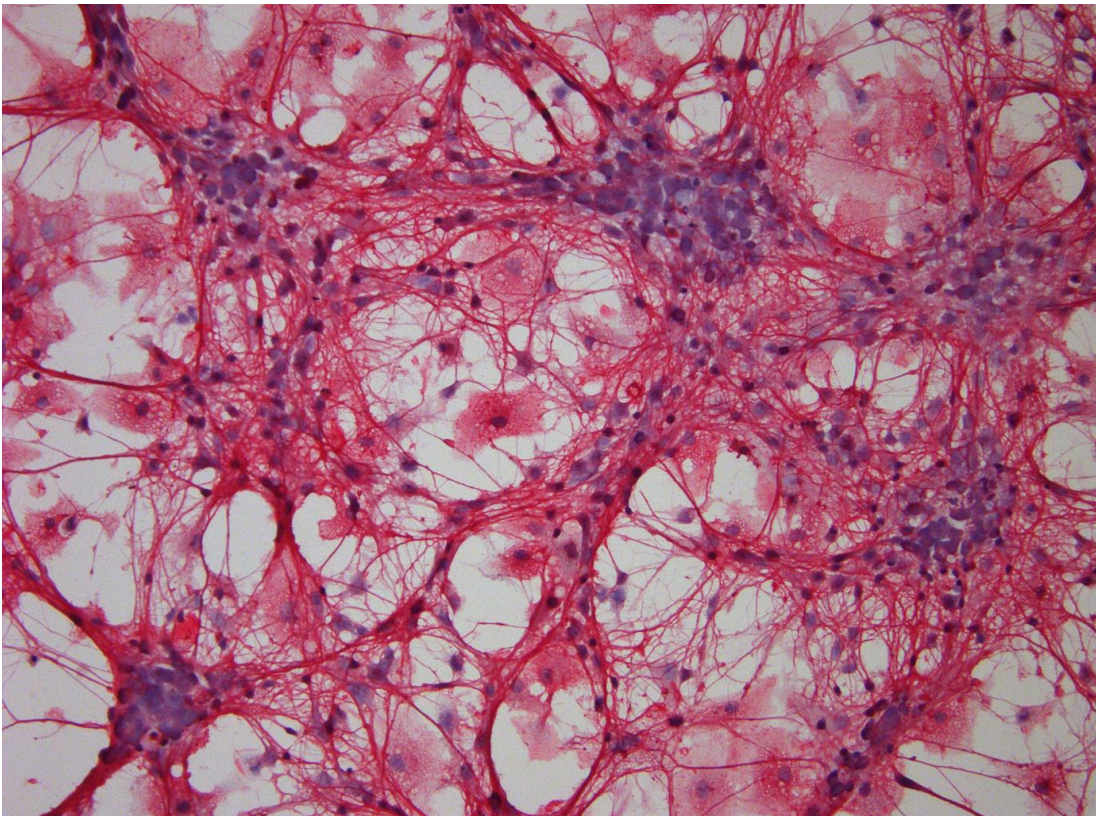


Abbildung 10 MG-N-Kokultur der P₃C-Gruppe nach 72h, zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe in Abbildung 8

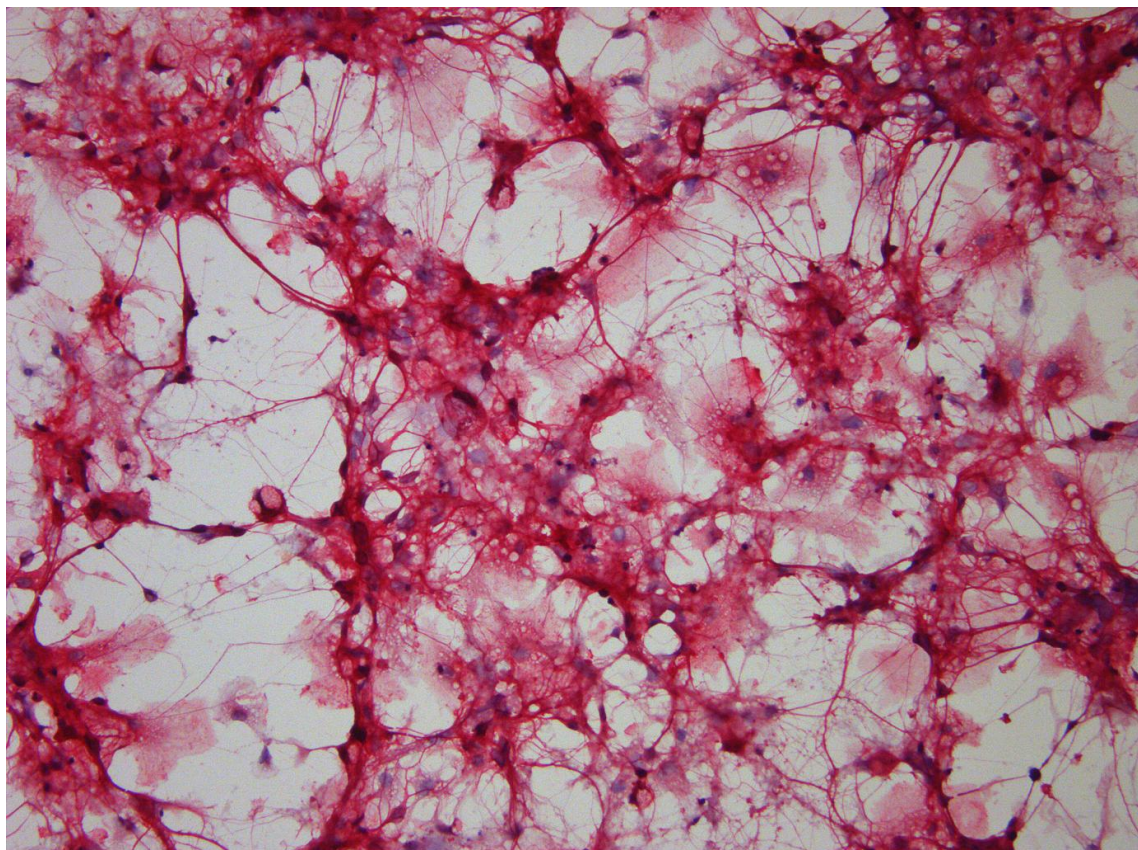


Abbildung 11 MG-N-Kokultur die durch die Kombination eines TLR-Agonisten (P_3C) mit $A\beta$ stimuliert wurde, Abbildung 8 zeigt zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe.

3.2.1 Stimulation der MG-N-Kokultur mit der endogenen Substanz $A\beta$, der exogenen Substanz P_3C und deren Kombination

Für die kombinierte Stimulation der MG-N-Kokultur mit der endogenen Substanz $A\beta$ und der exogenen Substanz P_3C , einem TLR-2-Agonisten, wurde $A\beta$ in einer Konzentration von $10\mu M$ und P_3C in einer Konzentration $10\mu g/ml$ verwendet, für die Kombinationsgruppe der beiden Substanzen wurden ebenfalls die o.g. Konzentrationen verwendet.

In der Auswertung der „crossing“- und „fibre“-Anzahl ist für die jeweiligen Einzelsubstanzen, $A\beta$ und P_3C , eine signifikante Neuronenschädigung nachgewiesen worden, weiterhin ist eine signifikante additive Neuronenschädigung bei der Verwendung von $A\beta$ und P_3C in Kombination erkennbar. Diese ist bei Verwendung der Substanzen in Kombination größer als bei der Stimulation durch die Einzelsubstanzen.

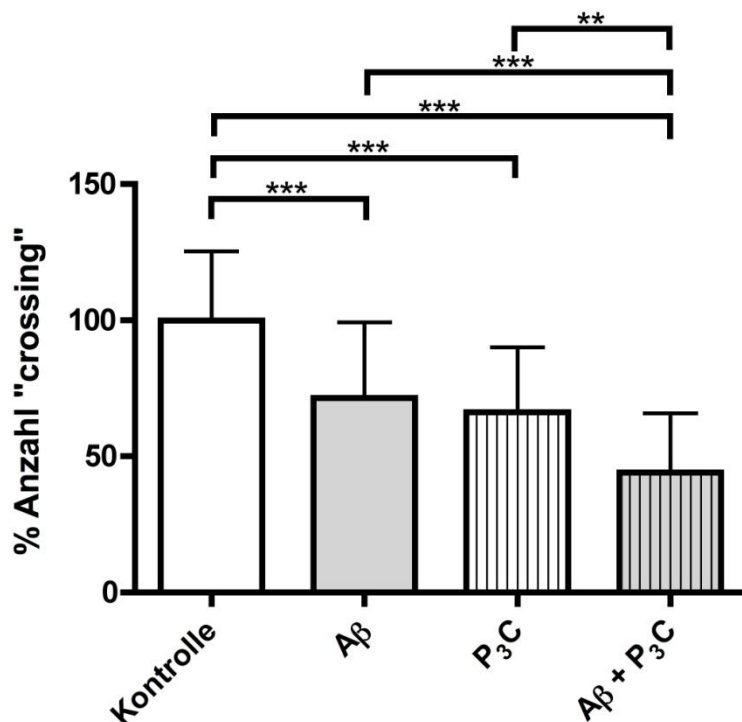


Abbildung 12 „crossing“-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M) (n=39), dem TLR-2-Agonisten P₃C (10 μ g/ml) (n=47) und deren Kombination A β (10 μ M) + P₃C (10 μ g/ml)(n=35) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „crossing“-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)

Die Anzahl der „crossing“ der Kontrollgruppe betrug 100% \pm 25,33. Für A β konnte eine Abnahme der „crossing“-Anzahl auf 71,39% \pm 27,83 (p<0,001) der Kontrollgruppe ermittelt werden, für P₃C nahm die Anzahl der „crossing“ auf 66,21% \pm 23,9 (p<0,001) der Kontrollgruppe ab und bei der Kombination von A β + P₃C nahm sie auf 44,05% \pm 21,70 (p<0,001) ab. Über das Bonferroni-Testverfahren ergab sich ein p-Wert von <0,001 für die Testung der A β -Gruppe vs die Kombinationsgruppe A β +P₃C. Ein p-Wert von <0,01 ergab sich für die Testung der P₃C-Gruppe vs die Kombinationsgruppe A β +P₃C.

In der Auswertung der „fibre“-Anzahl wurde für die Kontrollgruppe ein Mittelwert von 100% \pm 17,15 ermittelt, für A β betrug die Anzahl 81,01% \pm 17,47 (p<0,001) der „fibre“-Anzahl in der Kontrollgruppe, für P₃C betrug sie 74,43% \pm 18,69 (p<0,001) und für die Kombination aus A β +P₃C 65,46% \pm 12,75 (p<0,001). Der mittels Bonferroni-Testverfahren ermittelte p-Wert für die A β -Gruppe vs die Kombinationsgruppe A β +P₃C zeigte sich mit <0,05 signifikant, für die P₃C-Gruppe vs die Kombinationsgruppe A β +P₃C zeigte er sich nicht signifikant (p>0,05).

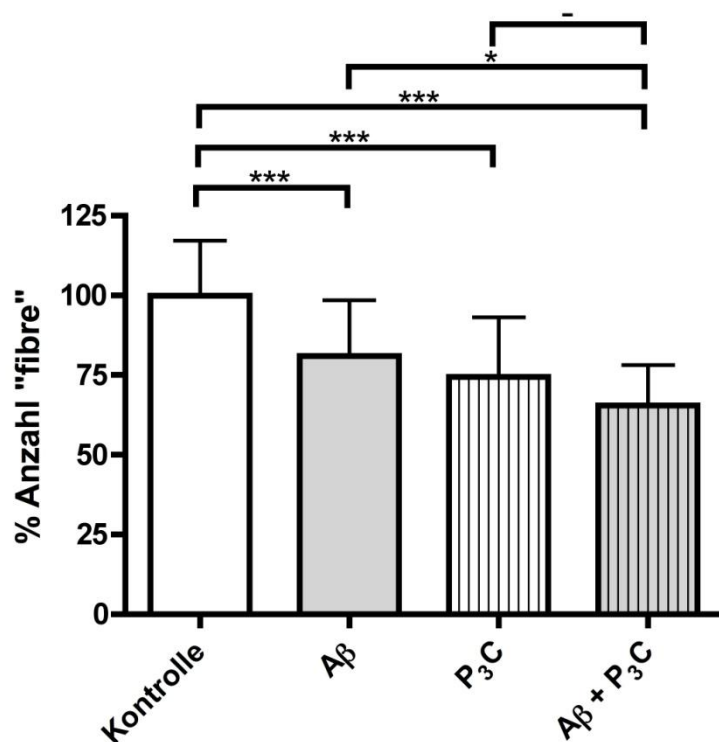


Abbildung 13 „fibre“-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M)(n=39), dem TLR-2-Agonisten P $_3$ C (10 μ g/ml)(n=47) und deren Kombination A β (10 μ M) + P $_3$ C (10 μ g/ml)(n=35) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „fibre“-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)

3.2.2 Stimulation der MG-N-Kokultur mit der endogenen Substanz A β , der exogenen Substanz LPS und deren Kombination

Auch bei der kombinierten Stimulation von MG-N-Kokulturen durch die endogene Substanz A β mit LPS, einem exogenen TLR-4-Agonisten, konnte ein additiver Neuronenschaden nachgewiesen werden. In dieser kombinierten Stimulation wurde A β in einer Konzentration von 10 μ M, der TLR-4-Agonist LPS wurde in den Konzentration 0,01 μ g/ml für LPS0,01 und 1 μ g/ml für LPS1 eingesetzt. Für die kombinierte Stimulation mit diesen Substanzen wurden ebenfalls die o.g. Konzentrationen verwendet.

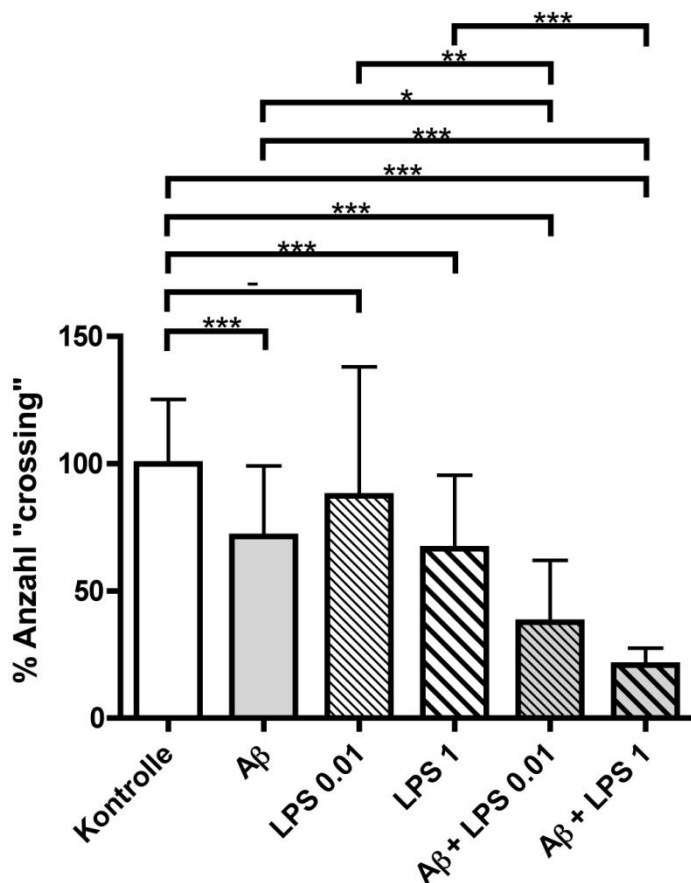


Abbildung 14 „crossing“-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M) (n=39) und dem TLR-4-Agonisten in den Konzentrationen LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=7), LPS 1 (1 μ g/ml) (n=21), deren Kombination A β (10 μ M) + LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=9) und A β (10 μ M) + LPS 1 (1 μ g/ml) (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „crossing“-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)

Der Mittelwert der „crossing“-Anzahl zeigte in der Kontrollgruppe 100% \pm 25,33. Hierzu zeigte sich im Vergleich in der A β -Gruppe ein Mittelwert von 71,39% \pm 27,83 (p<0,001) der „crossing“-Anzahl, in der LPS0,01-Gruppe 87,45% \pm 50,65 (p>0,05), in der LPS1-Gruppe 66,58% \pm 28,85 (p<0,001), in der Kombinationsgruppe A β +LPS0,01 37,66% \pm 24,34 (p<0,001) und in der Kombinationsgruppe A β +LPS1 20,78% \pm 6,727 (p<0,001). Bei der Ermittlung der p-Werte, mittels Bonferroni-Testverfahren, zeigte sich eine Signifikanz für die Einzelgruppen von A β , LPS0,01 und LPS1 gegen ihre jeweiligen Kombinationsgruppen. Genau stellten sich die p-Werte wie folgt dar, für A β vs A β +LPS0,01 mit p<0,05, für A β vs A β +LPS1 mit p<0,001, für LPS0,01 vs A β +LPS0,01 mit p<0,01 und für LPS1 vs A β +LPS1 mit p<0,001.

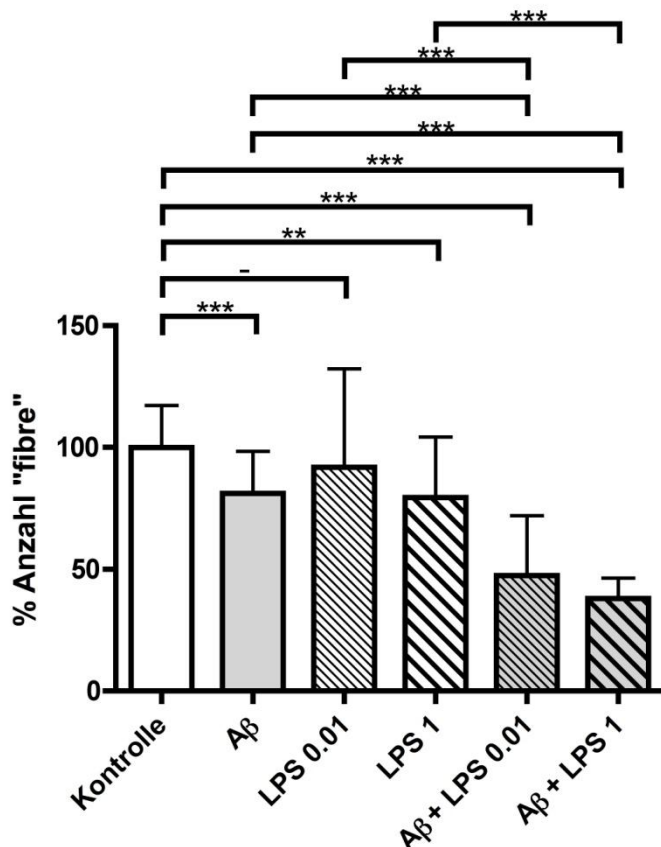


Abbildung 15 „fibre“-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M) (n=39) und dem TLR-4-Agonisten in den Konzentrationen LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=7), LPS 1 (1 μ g/ml) (n=21), deren Kombination A β (10 μ M) + LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=9) und A β (10 μ M) + LPS 1 (1 μ g/ml) (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „fibre“-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)

Die Kontrollgruppe zeigte für die „fibre“-Anzahl einen Mittelwert von 100% \pm 17,15. Hierzu im Vergleich zeigte sich für die A β -Gruppe ein Mittelwert von 81,01% \pm 17,47 (p<0,001) der „fibre“-Anzahl, für die LPS0,01-Gruppe 91,82% \pm 40,42 (p>0,05), für die LPS1-Gruppe 79,42% \pm 24,78 (p<0,01), für die Kombinationsgruppe A β +LPS0,01 47,47% \pm 24,45 (p<0,001) und für die Kombinationsgruppe A β +LPS1 37,91% \pm 8,43 (p<0,001). Die mittels Bonferroni-Testverfahren ermittelten p-Werte der Einzelsubstanzen, A β , LPS0,01 und LPS1, gegen ihre jeweilige Kombination zeigte signifikante p-Werte <0,001. Es wurde A β vs A β +LPS0,01 mit p<0,001, A β vs A β +LPS1 mit p<0,001, LPS0,01 vs A β +LPS0,01 mit p<0,001 und LPS1 vs A β +LPS1 mit p<0,001 getestet.

3.3 Stimulation der MG-N-Kokulturen mit den exogenen Substanzen in Form des TLR-2-Agonisten P₃C und des TLR-9-Agonisten CpG und deren Kombination

Bei der alleinigen Stimulation der MG-N-Kokulturen mit dem TLR-9-Agonisten CpG konnte keine signifikante Neuronenschädigung nachgewiesen werden, auch gelang dies nicht für die kombinierte Stimulation des TLR-2-Agonisten P₃C mit dem TLR-9-Agonisten CpG. Nur für die alleinige Stimulation mit TLR-2-Agonisten P₃C konnte eine signifikante Neuronenschädigung nachgewiesen werden.

Auf eine kombinierte Stimulation von A β und CpG, einem TLR-9-Agonisten, wurde bei dem mangelnden Nachweis eines Neuronenschadens durch die alleinige Stimulation der MG-N-Kokultur mit CpG verzichtet.

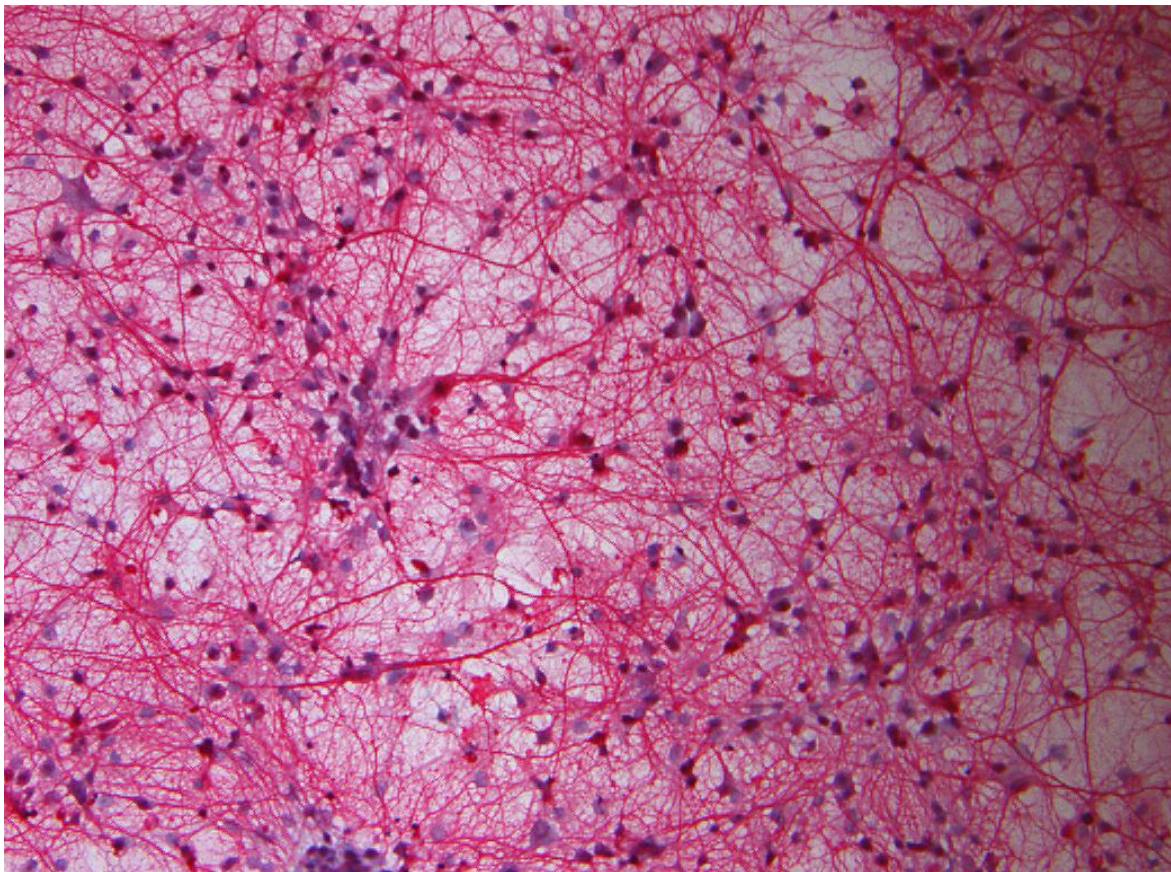


Abbildung 16 MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe nach 72h (ungeschädigt), gezeigt zur Veranschaulichung und zum Vergleich des Neuronenschadens, gefärbt mit Map-2 (Neurone - rot) und Hämalaun (Neuronen- und Mikrogliazellkerne - blau), 200-fache Vergrößerung

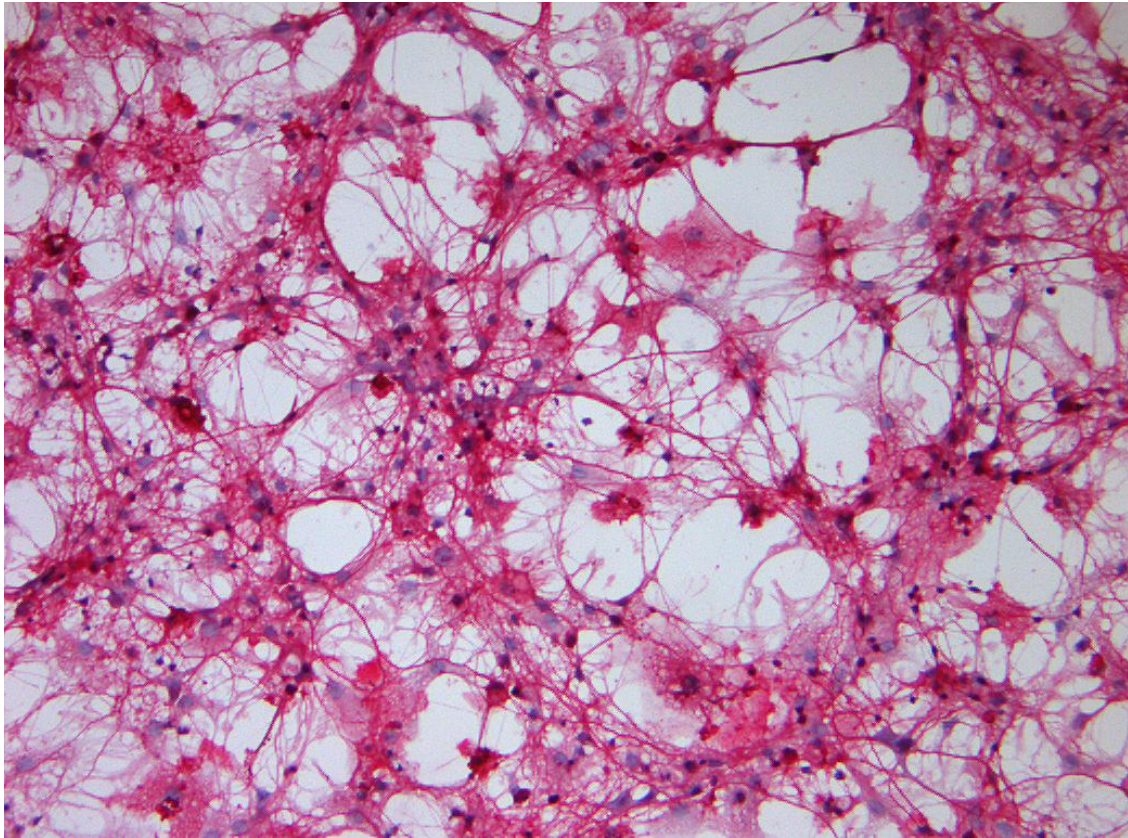


Abbildung 17 MG-N-Kokultur der P₃C10-Gruppe nach 72h, zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe in Abbildung 16

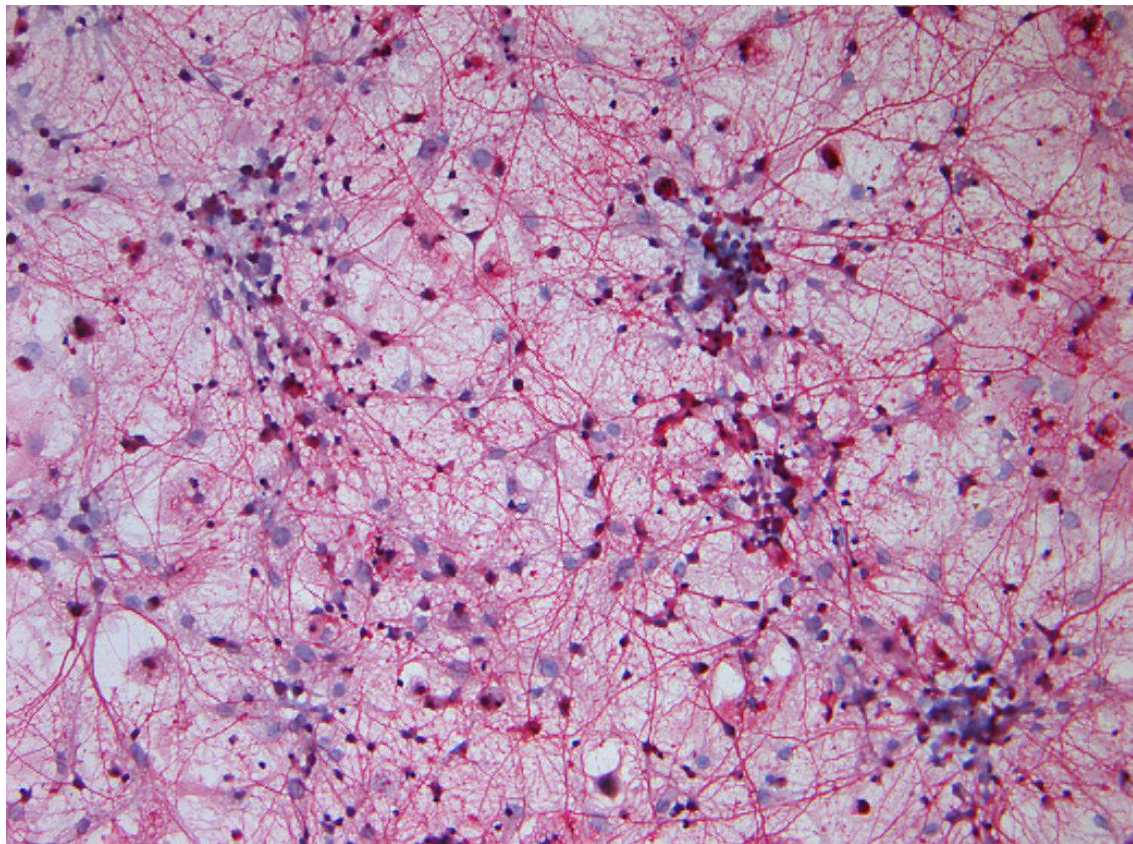


Abbildung 18 MG-N-Kokultur der CpG10-Gruppe nach 72h, zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe in Abbildung 16

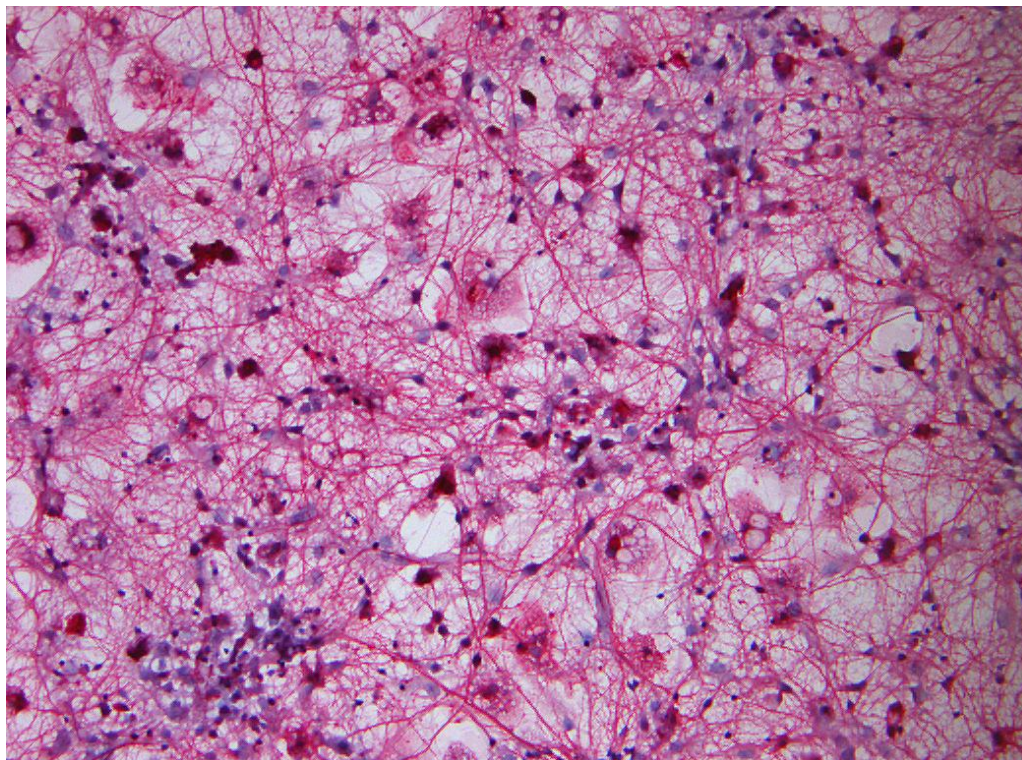


Abbildung 19 MG-N-Kokultur, die durch die Kombination des TLR-2-Agonisten P₃C10 und TLR-9-Agonisten CpG10 stimuliert wurde. Abbildung 16 zeigt zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe.

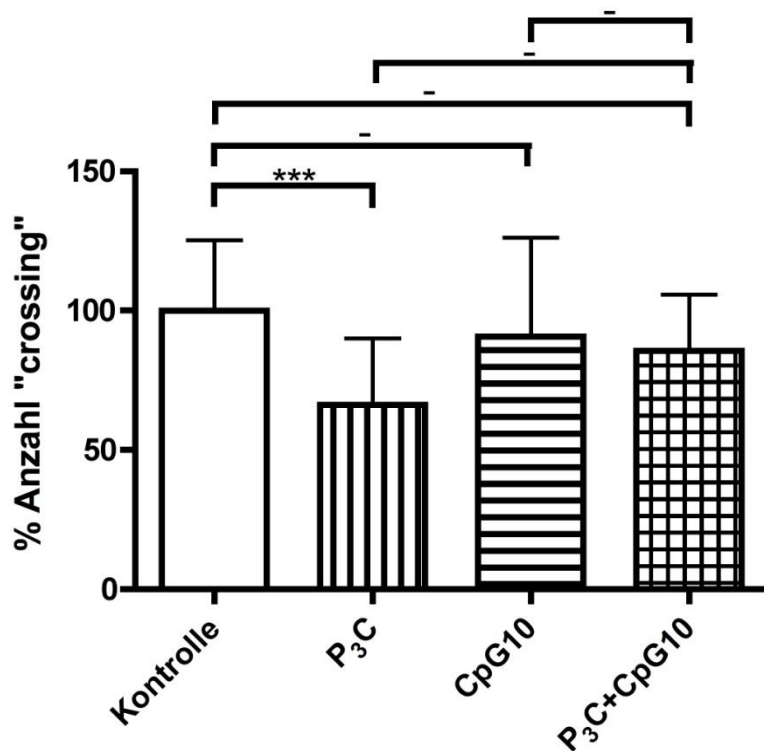


Abbildung 20 „crossing“-Anzahl bei Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem TLR-2-Agonisten P₃C (10µg/ml) (n=47), dem TLR-9-Agonisten CpG (10µg/ml) (n=25) und deren Kombination P₃C (10µg/ml) + CpG (10µg/ml) (n=14) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „crossing“-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen, die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p≥0,05)

Die Mittelwerte bei der Auswertung der „crossing“-Anzahl zeigten für die Kontrollgruppe 100% \pm 25,33. In der Gruppe P₃C zeigte sich hierzu im Vergleich ein Mittelwert von 66,21% \pm 23,9 ($p < 0,001$), in der Gruppe CpG10 90,72% \pm 35,44 ($p > 0,05$) und in der Kombinationsgruppe P₃C+CpG10 85,52% \pm 20,32 ($p > 0,05$). Die Ermittlung der p-Werte, mittels Bonferroni-Testverfahren, ergab für die Einzelsubstanzen P₃C und CpG10 gegenüber ihrer Kombination keine Signifikanz. Die p-Werte stellten sich mit $> 0,05$ sowohl für die Testung von P₃C vs P₃C+CpG10 als auch für die Testung von CpG10 vs P₃C+CpG10 dar.

Bei der Auswertung der „fibre“-Anzahl zeigte der Mittelwert für die Kontrollgruppe 100% \pm 17,15. Im Vergleich zur P₃C-Gruppe zeigte er sich mit 74,43% \pm 18,69, ($p < 0,001$), zur CpG10-Gruppe 93,39% \pm 27,41, ($p > 0,05$) und für die Kombinationsgruppe P₃C+CpG10 zeigte er sich mit 90,12% \pm 13,35, ($p > 0,05$). Auch hier ergab sich bei der Ermittlung der p-Wert, mittels Bonferroni-Testverfahren, bei der Testung der Einzelsubstanzen P₃C und CpG10 gegenüber ihrer Kombination keine Signifikanz. Die ermittelten p-Werte zeigten sich mit $> 0,05$ für die Testung von P₃C vs P₃C+CpG10, als auch für die Testung von CpG10 vs P₃C+CpG10.

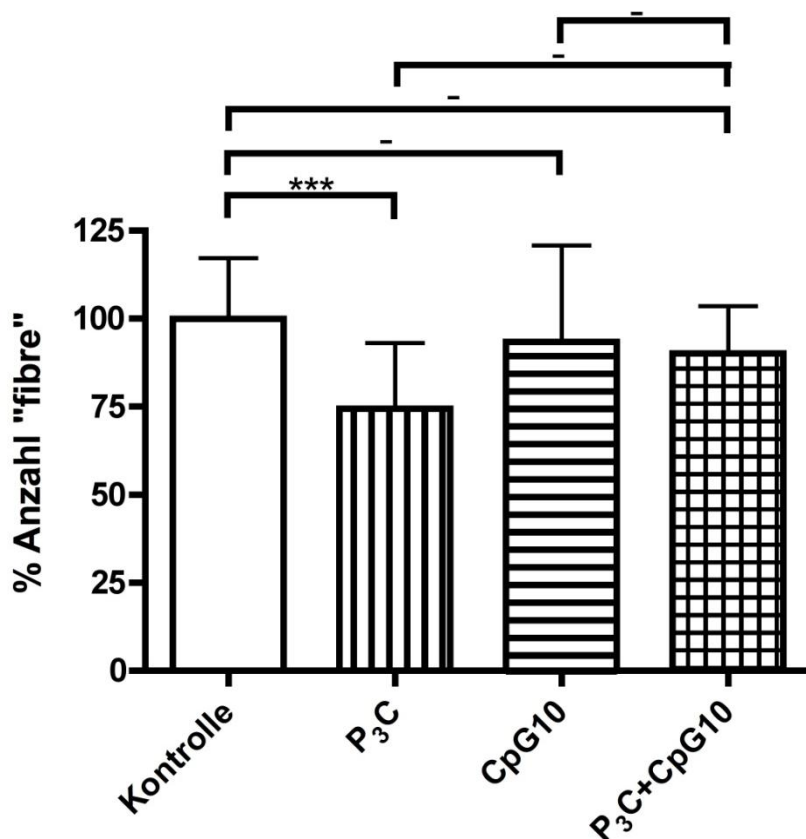


Abbildung 21 „fibre“-Anzahl bei Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem TLR-2-Agonisten P₃C (10 μ g/ml) (n=47), dem TLR-9-Agonisten CpG (10 μ g/ml) (n=25) und deren Kombination P₃C (10 μ g/ml)+ CpG (10 μ g/ml)(n=14) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „fibre“-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, - $p \geq 0,05$)

3.4 Einfluss von endogenen und exogenen Agenzien auf primär murine N-Kulturen

Um eine direkte neurotoxische Wirkung der Substanzen, welche nicht durch MG verursacht wurde, auszuschließen, wurden zur Kontrolle N-Zellkulturen ebenfalls mit den entsprechenden Substanzen stimuliert und anschließend, wie unter 2.2 beschrieben, ausgewertet.

Die Stimulation erfolgte in den gleichen Konzentrationen und die Auswertung nach dem gleichen Schema wie bei den MG-N-Kokulturen (siehe 2.2, Seite 11). Für die kombinierte Stimulation mit zwei Substanzen wurden die gleichen Konzentrationen wie bei der Stimulation mit den Einzelsubstanzen verwendet. Die Gruppengröße lag für die verschiedenen Gruppen zwischen 2 und 8 je Gruppe. In den so durchgeführten Kontrollexperimenten konnte kein signifikanter Neuronenschaden bei der Stimulation mit den endogenen und exogenen Substanzen allein und in ihrer Kombination in Abwesenheit von Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Nur die durchgeführte Negativkontrolle (Lysis) zeigte eine signifikante Schädigung.

Die genauen Werte stellten sich wie folgt dar: Der Mittelwert der „*crossing*“-Anzahl der Kontrollgruppe (n=6) betrug 100% \pm 48,96, im Vergleich hierzu zeigte der Mittelwert der Lysis-Gruppe (n=8) 25,23% \pm 7,345 ($p < 0,01$), bei der A β -Gruppe (10 μ M, n=8) zeigte sich der Mittelwert mit 134,0% \pm 55,45 ($p > 0,05$), bei der CpG10-Gruppe (10 μ g/ml, n=7) 115,3% \pm 31,6 ($p > 0,05$), bei der P₃C-Gruppe (10 μ g/ml, n=3) 119,0% \pm 5,045 ($p > 0,05$), bei der Kombinationsgruppe A β +P₃C (n=4) 81,08% \pm 21,89 ($p > 0,05$) und bei der Kombinationsgruppe CpG10+P₃C (n=2) 119,9% \pm 0,7154.

Die Ergebnisse zeigten sich in der ANOVA-Auswertung mit einem p-Wert von 0,0001. Die p-Werte wurden mittels Bonferroni-Korrektur für wiederholtes Testen für die jeweilige Substanzgruppe gegen die Kontrollgruppe ermittelt.

Die Auswertung der „*fibre*“-Anzahl zeigte ein ähnliches Bild: Die Kontroll-Gruppe (n=6) zeigte 100% \pm 31,91 der „*fibre*“-Anzahl, die Lysis-Gruppe (n=8) zeigte im Vergleich einen Mittelwert von 60,19% \pm 11,04 ($p < 0,05$), die A β -Gruppe (10 μ M, n=8) zeigte 118,9% \pm 28,65 ($p > 0,05$), die CpG10-Gruppe (10 μ g/ml, n=7) 112,2% \pm 14,45 ($p > 0,05$), die P₃C10-Gruppe (10 μ g/ml, n=3) 106,3% \pm 3,832 ($p > 0,05$), die Kombinationsgruppe A β +P₃C10 (n=4) 87,79% \pm 10,33 ($p > 0,05$) und die Kombinationsgruppe CpG10+P₃C (n=2) 107,% \pm 0,6337 ($p > 0,05$).

Diese Ergebnisse zeigten sich im ANOVA-Test mit einem p-Wert von 0,0001 signifikant. Die p-Werte wurden mittels Bonferroni-Korrektur für wiederholtes Testen für die jeweilige Substanzgruppe gegen die Kontrollgruppe ermittelt.

4. Diskussion

Mit dem eigens in der Cognition Network Language der Software Definiens Developer XD Version 1.0.0. entwickelten Auswertungsalgorithmus gelang es erstmals, einen durch Mikrogliazellen verursachten Neuronenschaden in in-vitro-Experimenten objektiv und voll automatisiert zu quantifizieren. Somit konnten hier die aus in-vivo-Experimenten und Beobachtungsstudien stammenden Daten, welche eine Neuronenschädigung nahelegen, mit denen im in-vitro-Modell einer Mikroglia-Neuronen-Kokultur verglichen werden.

Die unter 3.2 (Seite 24) gezeigte Neuronenschädigung durch $A\beta_{1-40}$ ließ sich auf die Mikrogliazellen zurückführen, da es im Kontrollexperiment zu keiner Neuronenschädigung gekommen war. Dieses deckt sich mit den im Punkt 1.3 (Seite 3) genannten Publikationen, so konnte $A\beta$ bereits vorher als potenter Aktivator von MG nachgewiesen werden (Meda et al. 1995). Auch konnte die Freisetzung von Neurotoxinen durch Mikrogliazellen im Zusammenhang mit senilen Plaques der AD bereits nachgewiesen werden (Giulian et al. 1995). Lotz et al. konnten 2005 für mit $A\beta_{1-40}$ stimulierte Mikrogliazellen eine erhöhte Ausschüttung von NO und $TNF\alpha$ im Vergleich zu einer nicht stimulierten Kontrollgruppe nachweisen, dieses geschah in einer reinen Mikrogliazellkultur, so dass hierdurch ein durch sie verursachter Neuronenschaden zwar vermutet, aber nicht gezeigt werden konnte. In anderen Versuchen konnte die Neurotoxizität von $A\beta$ ebenfalls gezeigt werden, so konnte bei der Verwendung des Subtyps $A\beta_{1-42}$ in höheren Konzentrationen ($6\mu M$) eine Neurotoxizität auch ohne Anwesenheit von MG nachgewiesen werden (Qin et al. 2002, Deshpande et al. 2006). Für die Verwendung von $A\beta_{1-42}$ in niedriger Konzentration ($<3\mu M$) konnte ein Neuronenschaden jedoch nur in Anwesenheit von Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Qin et al. 2002). Die verwendeten Konzentrationen dieser Experimente lassen sich jedoch nicht direkt mit den hier in der Arbeit dargestellten Ergebnissen ($A\beta$ -Konzentration $10\mu M$) vergleichen, da hier der Subtyp $A\beta_{1-40}$ und nicht, wie bei Qin et al. 2002 und Deshpande et al. 2006, der Subtyp $A\beta_{1-42}$ verwendet wurde.

Bei der Stimulation der MG durch TLR-Agonisten konnte unter 3.2.1 (Seite 26) und 3.2.2 (Seite 28) für die TLR-2 und -4 eine signifikante Neuronenschädigung nachgewiesen werden. Für den TLR-9 gelang dieses nicht.

Bei der Stimulation der Mikrogliazellen in der MG-N-Kokultur mittels des TLR-2-Agonisten P_3C konnte in den hier aufgezeigten Experimenten ein Rückgang der „crossing“-Anzahl um mehr als 30% gezeigt werden. Ebenfalls in einer TLR-2-Stimulation, mittels Gruppe-B-Streptococcus, konnte mittels immunhistochemischer Färbung und manueller Auszählung ein mikroglial verursachter Neuronenschaden nachgewiesen werden (Lehnardt et al. 2006). Hoffmann et al. publizierten 2007 ebenfalls einen durch Färbung und Auszählung beobachteten Neuronenschaden bei Tiermodellen, in welchem die Tiere intrathekal mit dem TLR-2-Agonisten P_3C behandelt wurden. Durch diese

Stimulation mit dem TLR-2-Agonisten P₃C konnte im Gegensatz zu den von Lehnardt et al. 2006 publizierten Daten eine Mitbeteiligung der Bakterien am induzierten Neuronenschaden ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse zeigten sich auch im Vergleich zu den von Lotz et al. 2005 und Ebert et al. 2005 gezeigten Ergebnissen als schlüssig. Weiterhin wurde gezeigt, dass Mikrogliazellen, welche über TLR-2-Agonisten stimuliert wurden, eine gesteigerte Phagozytose von A β (Chen et al. 2006) und *Streptococcus pneumoniae* (Ribes et al. 2010) im Vergleich zu einer nicht stimulierten Kontrollgruppe aufwiesen.

Ebenfalls konnte für mit dem TLR-4-Agonisten LPS behandelte Mikrogliazellkulturen zumindest in der höheren Konzentration (1 μ g/ml) eine signifikante Neuronenschädigung nachgewiesen werden. In der geringeren Konzentration von 0,01 μ g/ml lässt sich zwar der Trend einer Neuronenschädigung erkennen, das Ergebnis zeigt sich jedoch nicht signifikant. Die o.g. Publikationen (Lotz et al. 2005, Ebert et al. 2005, Ribes et al. 2010) zeigten zumindest für die Stimulation mit der höheren Konzentration LPS äquivalente Ergebnisse, auch konnte eine MG-Aktivierung durch den TLR-4-Agonisten LPS durch Qin et al. 2005 nachgewiesen werden. Für die Stimulation mit dem TLR-4-Agonisten LPS fehlt in den hier erhobenen Daten das Kontrollexperiment, welches eine alleinige Schädigung der Neuronen ohne das Vorhandensein von Mikrogliazellen zeigt. Es wurde jedoch durch Lehnardt et al. 2003 gezeigt, dass Mikrogliazellen im Gegensatz zu Neuronen den TLR-4 exprimieren und eine Neuronenschädigung über den TLR-4-Agonisten ohne das Vorhandensein von Mikrogliazellen bei unveränderter Dosierung von LPS nicht möglich ist. Diese 2003 von Lehnardt et al. publizierten Ergebnisse decken sich mit den hier unter Punkt 3.2.2 (Seite 28) erzielten Ergebnissen, obwohl sie LPS in der zehnfachen Konzentration verwendeten. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die durch den TLR-4-Agonisten LPS aktivierten MG nicht spezifisch nur Neuronen schädigen, in gemischten Gliakulturen konnte nachgewiesen werden, dass ebenfalls Oligodendrozyten durch TLR-4-aktivierte Mikrogliazellen geschädigt werden (Lehnardt et al. 2002).

Für die Stimulation mit dem TLR-9-Agonisten CpG konnte keine signifikante Neuronenveränderung nachgewiesen werden. In anderen Experimenten konnte eine signifikante neurotoxische Wirkung bei der Stimulation mit CpG, einem TLR-9-Agonisten, in der Konzentration von 10 μ M nachgewiesen werden (Iliev et al. 2003). In Experimenten, bei welchen reine Mikrogliazellkulturen verwendet wurden, konnte auch eine erhöhte Aktivität der MG bei der Stimulation mit dem TLR-9-Agonisten CpG beobachtet werden (Lotz et al. 2005, Ebert et al. 2005, Ribes et al. 2010). Diese erhöhte Aktivität der MG ließ sich jedoch auch durch Doi et al. 2009 in MG-N-Kokulturen nicht nachweisen, ebensowenig eine Neuronenschädigung. Allerdings waren die von Doi verwendeten Dosierungen mit den hier verwendeten nicht identisch, und die Experimente sind deshalb nicht direkt vergleichbar.

Die unter 3.3 (Seite 31) aufgeführte kombinierte Stimulation mit den TLR-2- und TLR-9-Agonisten zeigte keine signifikante additive Neuronenschädigung. Dies deckt sich mit den Beobachtungen, die Doi et al. 2009 und Lotz et al. 2005 in kombinierten Stimulationen mit CpG beschrieben haben. Es ist aber anzumerken, dass beide A β als Kombinationspartner verwendet haben. Wie bereits erwähnt, konnten Doi et al. 2009 aber auch für CpG als alleinigen MG-Stimulator keinen neurotoxischen Effekt nachweisen. In der Beobachtung primärer muriner Mikrogliazellkulturen von Ebert et al., die 2005 publiziert wurden, kam es jedoch bei der kombinierten Stimulation mit CpG und P₃C zu einer additiven Aktivierung von MG und damit zu erhöhter Freisetzung von NO.

Die Ergebnisse unter 3.2.1 (Seite 26) zeigen eine deutliche additive Neuronenschädigung in den vorliegenden MG-N-Kokulturen bei gleichzeitiger Stimulation mit A β und dem TLR-2-Agonisten P₃C. Im Vergleich zum Schädigungsgrad der Neuronen bei der alleinigen Stimulation mit den o.g. Einzelsubstanzen lässt sich bei der gleichzeitigen Stimulation mit einem Substanzgemisch der beiden Einzelsubstanzen ein deutlicher und signifikant additiver Neuronenschaden erkennen (siehe Abbildung 12 und 13). Im Vergleich zu den Kontrollexperimenten unter 3.4 (Seite 35), bei welchen es durch die Einzelsubstanzen und deren Kombination zu keiner signifikanten Neuronenschädigung kommt, lässt sich die Neuronenschädigung somit auf die Aktivität der Mikrogliazellen zurückführen. Dieses stimmt auch mit den durch Lotz et al. erzielten und 2005 publizierten Ergebnissen überein. Ihnen gelang der Nachweis, dass es - im Vergleich zur Aktivierung durch die Einzelsubstanzen - bei der Stimulation von Mikrogliazellen mit dem TLR-2-Agonisten P₃C und A β in Kombination zu einer additiven Aktivierung und damit erhöhten Freisetzung von NO und TNF α kommt. In einer anderen Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Mikrogliazellen durch die simultane Stimulation mit einem TLR-2-Agonisten, hier Peptidoglycan, in Kombination mit A β verstärkt zur Phagozytose angeregt wurden (Chen et al. 2006).

Die Beobachtungen der additiven Neuronenschädigung für die Kombination des TLR-4-Agonisten LPS mit A β decken sich ebenfalls mit den von Lotz et al. 2005 publizierten Ergebnissen der erhöhten Mikrogliazell-Aktivität. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen sogar eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für den Zusammenhang der Neuronenschädigung mit der Höhe der LPS-Dosis. So konnte die LPS_{0,01}-Gruppe noch keinen signifikanten Neuronenschaden erzeugen, der sich jedoch in Kombination mit A β deutlich zeigte. Der durch die Kombination der Gruppen LPS₁ und A β erzeugte Neuronenschaden zeigte dann einen höheren Schädigungsgrad als die Kombination von A β mit LPS_{0,01}. Es gelang nun der Nachweis, dass diese bereits durch Lotz et al. 2005 beschriebene additive Mikrogliazell-Aktivität in Zusammenhang mit A β in vitro zu einer ebenfalls additiven Neuronenschädigung führt.

Diese additive Neuronenschädigung konnte auch durch Combrinck et al. 2002 und Cunningham et al. 2005 im Tierexperiment nachgewiesen werden, bei Tiermodellen

neurodegenerativer Erkrankungen und einer experimentellen Entzündungsinduktion durch LPS. Dieses deckt sich auch mit den Beobachtungen des Krankheitsfortschrittes im Rahmen einer systemischen Entzündung bei vorliegender AD (Nee und Lipka 1999).

A β ist, wie bereits oben erwähnt, als ein potenter Aktivator der MG zu sehen (Meda et al. 1995, Brown et al. 1996), jedoch ist letztlich der Mechanismus der Mikrogliazellaktivierung durch A β noch nicht bekannt und damit auch der Mechanismus der additiven Aktivierung durch endogene und exogene Stimulanzen nicht. Die Aktivierung der MG durch A β kann über die verschiedenen Zelloberflächenrezeptorkomplexe CD 14, CD 36, CD 47 und $\alpha(1)\beta(6)$ -Integrin laufen und mündet letztlich in der Aktivierung eines intrazellulären Tyrosin-Cascade-Signalweges (Reed-Geaghan et al. 2009, Bamberger et al. 2003). Für die fibrilläre Form des A β , wie sie bei der AD vorliegt, ist aber auch beschrieben, dass CD14, TLR-2 und TLR-4 für die Aktivierung von Mikrogliazellen vorhanden sein müssen, da MG bei Versuchstieren ohne diese Rezeptoren nicht aktiviert werden konnten (Reed-Geaghan et al. 2009).

In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass bei der in-vitro-Versuchsanordnung, wie bei den meisten Zellkulturexperimenten zur AD, das A β in gelöster und nicht fibrillärer Form verwendet wurde. Bei der AD liegt A β jedoch hauptsächlich in fibrillärer Form vor und verursacht in diesem Zustand die Aktivierung der MG (Cameron und Landreth 2010). In einem AD-Tiermodell konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen den A β -Plaques und aktivierten MG-Kulturen nachgewiesen werden (Maeda et al. 2007). Es konnte weiterhin der Nachweis erbracht werden, dass A β in fibrillärer Form einen Neuronenschaden verursachen kann, jedoch wird hierfür im Vergleich zur gelösten Form eine höhere Konzentration benötigt (Deshpande et al. 2006). In den meisten Zellkulturexperimenten zur AD wird A β in gelöster Form verwendet. Lotz et al. konnten 2005 in diesem Zusammenhang beobachten, dass es bei 24-stündiger Inkubation von gelöstem A β_{1-40} bei 37°C in Zellkulturmedium zur Bildung von Dimeren und größeren Oligomeren kommt. Bei Anwesenheit von Mikrogliazellen war die Menge der Pentamere, Hexamere, Octamere und Decamere von A β_{1-40} deutlich geringer, was darauf hinweist, dass besonders größere A β -Oligomere von Mikrogliazellen gebunden bzw. internalisiert werden (Lotz et al., 2005).

Es ist auch anzumerken, dass in den o.g. Tiermodellen der potente TLR-4-Agonist LPS in hohen Dosen verwendet wurde, um eine systemische Infektion zu simulieren. In einer durch Ebert et al. 2005 publizierten Studie konnte LPS als potentester Mikrogliazellaktivator, im Vergleich zu einigen anderen TLR-Agonisten, nachgewiesen werden. Der Versuch, in einem Tiermodell neurodegenerativer Erkrankungen eine Beschleunigung des Krankheitsprozesses mittels intraperitonealer Injektion von *Streptococcus pneumoniae*, anstatt LPS nachzuweisen, gelang jedoch nicht (Ebert et al. 2010).

Im Vergleich des prozentualen Neuronenschadens durch die hier genutzten Agenzien war bei Stimulationen der MG-N-Kokulturen mit nur einem Agens der TLR-2-Agonist P₃C

der stärkste Aktivator. Bei der kombinierten Stimulation der MG-N-Kokulturen mit A β wies der TLR-4-Agonist LPS den stärksten Schädigungsfaktor auf. Betrachtet man diese Ergebnisse, spiegeln sie sich in den genannten Tiermodellen wider. So fällt auf, dass die Stimulation mittels *Streptococcus pneumoniae*, eines Gram-positiven TLR-2-Agonisten, in Modellen neurodegenerativer Erkrankungen keinen nachweisbaren Schaden verursachte (im Tiermodell nicht nachweisbar, Ebert et al. 2010), im Gegensatz zur Stimulation von Modellen neurodegenerativer Erkrankungen mit LPS (Neuronenschädigung im Tiermodell ermittelbar, Combrinck et al. 2002, Cunningham et al. 2005 und Cunningham et al. 2009), einem Bestandteil Gram-negativer Bakterien. Möglicherweise scheint die additive Wirkung der kombinierten Stimulation von Mikrogliazellen bei Gram-negativen Bakterien stärker zu sein. Allerdings sollte für eine solche vergleichbare Aussage zu den Experimenten in Tiermodellen überprüft werden, ob es sich auch bei der Verwendung eines Gram-negativen Bakteriums und nicht nur bei Verwendung des TLR-4-Agonisten Analogs LPS so verhält. Eine direkte Vergleichbarkeit bezüglich einer erhöhten Wirk- bzw. Aktivierungsstärke Gram-positiver oder Gram-negativer Bakterien unter Verwendung eines TLR-4-Agonisten ist nicht möglich, da sich der verwendeten LPS-Dosis keine äquivalente Bakterienkonzentration Gram-negativer Bakterien zuordnen lässt.

Mit Hilfe des entwickelten Auswertungsalgorithmus könnte nun in weiteren in-vitro-Experimenten versucht werden, beispielsweise eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu ermitteln, welche für in-vivo-Experimente Rückschlüsse auf Äquivalenzdosen zulässt, oder es könnte versucht werden, Strategien zu entwickeln, um in vitro eine Reduktion des neurotoxischen Effektes zu erreichen.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, einen additiven Neuronenschaden zu quantifizieren, der durch die kombinierte Mikrogliazellstimulation mit einem TLR-2- oder TLR-4-Agonisten und A β verursacht wird. Hiermit konnten auch die u.a. durch Nee und Lippa 1999 veröffentlichten Beobachtungen, dass eine AD im Zusammenhang mit systemischen Infektionen voranschreitet, in einem in-vitro-Modell nachgewiesen werden.

Durch den entwickelten Auswertungsalgorithmus in der Cognition Network Language der Software Definiens Developer XD Version 1.0.0. gelang es erstmals, die Bilder verschiedener Experimente automatisiert nach den gleichen objektiven Maßstäben auszuwerten. Dabei musste der Auswertungsalgorithmus nicht an Unterschiede, wie z.B. eine geänderte Belichtung, angepasst werden. Dieses macht den entwickelten Auswertungsalgorithmus auch für weitere MG-N-Kokulturen, sogar mit veränderter Färbung, einsetzbar.

Durch diese Quantifizierung konnte der Neuronenschaden, welcher durch die Aktivierung der Mikrogliazellen einzeln oder in Kombination von den TLR-2-Agonisten (P₃C), TLR-4-Agonisten (LPS) und A β hervorgerufen wird, verglichen werden. Bei Betrachtung der Einzelsubstanzen zeigte sich die stärkste Schädigung durch den TLR-2-Agonisten P₃C, das synthetische Analogon zu Zellwandbestandteilen Gram-positiver Zellen. Bei der kombinierten Stimulation wurde der größte Nervenzellschaden durch die Kombination des TLR-4-Agonisten LPS mit A β gemessen. Dieser Schädigungsgrad, verursacht durch einzelne oder kombinierte Substanzen, könnte mit dem entwickelten Auswertungsalgorithmus in nächster Zeit weiter untersucht werden, um so mögliche neuroprotektive Strategien zu entwickeln und zu überprüfen. Somit könnten mögliche Behandlungsoptionen überprüft und weiterentwickelt werden, wie beispielsweise die Verwendung von Antibiotika, die zu einer geringeren Freisetzung bakterieller Substanzen führen, um so ein Fortschreiten des Neuronenschadens bei der AD im Zusammenhang mit systemischen Infektionen zu verhindern.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

±	- Standardabweichung
AD	- Demenz vom Alzheimer Typ
APAAP	- Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
APC	- Antigen-präsentierenden Zellen
APP	- Amyloid-Vorläufer-Protein
Aqua bidest.	- Aqua bidestillata
Aqua dest.	- Aqua destillata
Aβ	- β-Amyloid
CO ₂	- Kohlenstoffdioxid
CpG	- Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DMEM	- Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
E	- Embryonalstadium (z.B. E15= 15 Tage alter Embryo)
EOAD	- Early onset Demenz vom Alzheimer Typ
FCS	- Foetal Bovine Serum
IFN _γ	- Interferon _γ
IL-1β	- Interleukin-1β
IL-6	- Interleukin-6
LOAD	- Late-onset Demenz vom Alzheimer Typ
LPS	- Lipopolysaccharide
MG	- Mikrogliazellen
MG-N-Kokultur	- Mikroglia-Neuronen-Kokultur
MHCI	- Major-Histocompatibility-Complex-I-Moleküle
MHCII	- Major-Histocompatibility-Complex-II-Moleküle
n	- Anzahl
N-Kulturen	- Neuronen-Zellkulturen
NBM	- Neurobasalmedium
NFκB	- Nuclear Factor κ B
NO	- Stickstoffmonoxid
NSAR	- nichtsteroidalen Antirheumatika
NSE	- Neuronenspezifische Enolase
P ₃ C	- Pam3CSK
PAMPs	- Pathogen-associated molecular Patterns
PBS	- Phosphat-gepufferte Salzlösung
PLL	- Poly-L-Lysin

PS	- Penicillin / Streptomycin
RT	- Raumtemperatur
TBS	- Tris-buffered Saline
TGF- β 1	- Transforming Growth Factor- β 1
TLR	- Toll-like Rezeptor(en)
TNF	- Tumor-Nekrose-Faktor
ZNS	- Zentrales Nervensystem

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Screenshot mit der Einstellung der <i>multiresolution segmentation</i> im entwickelten <i>ruleset</i> des Definiens Developer XD Version 1.0.0.	15
Abbildung 2	Darstellung der hierarchischen Beziehung von Objekten in Anlehnung an Abb. 3.11 aus Tomowski et al. 2006	16
Abbildung 3	Screenshot im Ablauf des entwickelten <i>ruleset</i> nach der abgelaufenen <i>multiresolution segmentation</i> , durchlaufener „ <i>watershed</i> “-Funktion, Klassifikation und Zusammenlegung der Kernsegmente. In der Abbildung sind bis auf die erkennbaren großen Zellkerne die noch unveränderten Segmente zu erkennen. Zum Vergleich sind in der Abbildung 7 die Segmente der Kerne noch nicht klassifiziert und zusammengefasst.	17
Abbildung 4	Screenshot im Ablauf des <i>ruleset</i> . An dieser Stelle sind im linken Teil des Bildes die bereits klassifizierten Zellkerne (bläulich) und die klassifizierten „Axon“ (gelb) erkennbar, wobei die „Axon“ noch nicht subklassifiziert wurden. Im rechten Teil des Bildes ist die Bedienungsfläche mit einem Teil der Einstellungen des <i>ruleset</i> der Definiens Developer XD 1.0.0. Software abgebildet.	17
Abbildung 5	Ausschnitt eines Screenshot im Ablauf des <i>ruleset</i> der Definiens Developer XD 1.0.0. Software nach der Subklassifikation der Axonsegmente. Die farbliche Zuordnung der Klassen sowie das <i>ruleset</i> sind im rechten Bildabschnitt erkennbar. Im linken Bildteil sieht man das originale Bild mit der farblichen Überlagerung der Axonsubklassen.	18
Abbildung 6	Das entwickelte <i>ruleset</i> . Aus Gründen der Darstellbarkeit sind nicht alle Menüfelder in einem Bild geöffnet, die Darstellung erfolgt nach ihrem Ablauf im <i>ruleset</i> . Die Menüpunkte der <i>multiresolution segmentation</i> und Kerndefinierung sind im linken Bildabschnitt geöffnet, die Zellausläuferdefinition und Subklassifizierung sind im rechten Bildabschnitt ersichtlich.	21
Abbildung 7	Screenshot im Ablauf des <i>ruleset</i> . Im Bildteil a ist die originale Aufnahme sichtbar. Im Bildabschnitt b ist nur die <i>multiresolution segmentation</i> des <i>ruleset</i> abgelaufen. Eine Klassifikation von Objekten hat zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden. Im eingerahmten Bildabschnitt lassen sich die Segmente mit einer stärkeren Färbung erkennen. Diese Segmente stellten ein Problem bei der Klassifikation der Axonsubklasse „ <i>single</i> “ dar. Auf Grund der hohen Vergrößerung (200-fach, und hier noch einmal mit 400% Zoom des Originalbildes) lässt sich nur eine spekulative Aussage über die Ursache der Verfärbung treffen. Es könnte sich sowohl um Zellfragmente, als auch um Pixelfehler im Rahmen der digitalen Bildaufnahme handeln.	22
Abbildung 8	MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe nach 72h (ungeschädigt), gezeigt zur Veranschaulichung und zum Vergleich des Neuronenschadens, gefärbt mit Map-2 (Neurone – rot) und Hämalaun (Neuronen- und Mikrogliazellkerne - blau), 200-fache Vergrößerung	24
Abbildung 9	MG-N-Kokultur der A β -Gruppe nach 72h, in Abbildung 8 zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur	25
Abbildung 10	MG-N-Kokultur der P $_3$ C-Gruppe nach 72h, zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe in Abbildung 8	25
Abbildung 11	MG-N-Kokultur die durch die Kombination eines TLR-Agonisten (P $_3$ C) mit A β stimuliert wurde, Abbildung 8 zeigt zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe.	26
Abbildung 12	„ <i>crossing</i> “-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M) (n=39), dem TLR-2-Agonisten P $_3$ C (10 μ g/ml) (n=47) und deren Kombination A β (10 μ M) + P $_3$ C (10 μ g/ml)(n=35) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „ <i>crossing</i> “-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)	27

Abbildung 13	„ <i>fibres</i> “-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M)(n=39), dem TLR-2-Agonisten P ₃ C (10 μ g/ml)(n=47) und deren Kombination A β (10 μ M) + P ₃ C (10 μ g/ml)(n=35) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „ <i>fibres</i> “-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)	28
Abbildung 14	„ <i>crossing</i> “-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M) (n=39) und dem TLR-4-Agonisten in den Konzentrationen LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=7), LPS 1 (1 μ g/ml) (n=21), deren Kombination A β (10 μ M) + LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=9) und A β (10 μ M) + LPS 1 (1 μ g/ml) (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „ <i>crossing</i> “-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)	29
Abbildung 15	„ <i>fibres</i> “-Anzahl bei der Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem endogenen Stimulans A β (10 μ M) (n=39) und dem TLR-4-Agonisten in den Konzentrationen LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=7), LPS 1 (1 μ g/ml) (n=21), deren Kombination A β (10 μ M) + LPS 0,01 (0,01 μ g/ml) (n=9) und A β (10 μ M) + LPS 1 (1 μ g/ml) (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „ <i>fibres</i> “-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)	30
Abbildung 16	MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe nach 72h (ungeschädigt), gezeigt zur Veranschaulichung und zum Vergleich des Neuronenschadens, gefärbt mit Map-2 (Neurone - rot) und Hämalaun (Neuronen- und Mikrogliazellkerne - blau), 200-fache Vergrößerung	31
Abbildung 17	MG-N-Kokultur der P ₃ C10-Gruppe nach 72h, zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe in Abbildung 16	32
Abbildung 18	MG-N-Kokultur der CpG10-Gruppe nach 72h, zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe in Abbildung 16	32
Abbildung 19	MG-N-Kokultur, die durch die Kombination des TLR-2-Agonisten P ₃ C10 und TLR-9-Agonisten CpG10 stimuliert wurde. Abbildung 16 zeigt zum Vergleich eine nicht geschädigte MG-N-Kokultur der Kontrollgruppe.	33
Abbildung 20	„ <i>crossing</i> “-Anzahl bei Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem TLR-2-Agonisten P ₃ C (10 μ g/ml) (n=47), dem TLR-9-Agonisten CpG (10 μ g/ml) (n=25) und deren Kombination P ₃ C (10 μ g/ml) + CpG (10 μ g/ml)(n=14) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „ <i>crossing</i> “-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen, die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)	33
Abbildung 21	„ <i>fibres</i> “-Anzahl bei Stimulation der MG-N-Kokultur mit dem TLR-2-Agonisten P ₃ C (10 μ g/ml) (n=47), dem TLR-9-Agonisten CpG (10 μ g/ml) (n=25) und deren Kombination P ₃ C (10 μ g/ml)+ CpG (10 μ g/ml)(n=14) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=47). Die „ <i>fibres</i> “-Anzahl der Kontrollgruppe wurde mit 100% angenommen und die Darstellung erfolgte per Mittelwert und Standardabweichung. (***) p<0,001; ** p<0,01, * p<0,05, - p \geq 0,05)	34

6.3. Tabellenverzeichnis

Seiten 9 bis11

- Tabelle 1 - zeigt eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien
- Tabelle 2 - zeigt eine Übersicht über die verwendeten Lösungen und Medien
- Tabelle 3 - zeigt eine Übersicht über die verwendeten Geräte
- Tabelle 4 - zeigt eine Übersicht über die verwendete Software
- Tabelle 5 - zeigt eine Übersicht über das verwendete Verbrauchsmaterial

6.4 Literaturverzeichnis

- (Bamberger et al. 2003) Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE (2003): A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglia activation. *J Neurosci* 23, 2665-2674
- (Beard et al.1996) Beard CM, Kokmen E, Sigler C, Smith GE, Petterson T, O ´Brien PC (1996): Cause of death in Alzheimer ´s disease. *Ann Epidemiol* 6-13, 195-200
- (Bickel 2008) Bickel H, Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. (2008): Das Wichtigste 1 Die Epidemiologie der Demenz. Elektronisches Dokument. [Zugriff: 30.04.2010, <http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01.pdf>]
- (Bird 2010) Bird TD (2010): Alzheimer Disease Overview. Elektronisches Dokument. GeneReviews initial Posting October 23, 1998; Last Update March 30, 2010. [Zugriff: 02.05.2010, PMID:20301340]
- (Blatteis 1992) Blatteis CM (1992): Chapter 53: Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res* 91, 409-412
- (Braun et al. 2001) Braun JS, Novak R, Murray PJ, Eischen CM, Susin SA, Kroemer G, Halle A, Weber JR, Tuomanen, Cleveland JL (2001): Apoptosis-Inducing Factor Mediates Microglia and Neuronal Apoptosis Caused by Pneumococcus. *J Infect Dis* 184, 1300-1309
- (Brown et al. 1996) Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA (1996): Role of Microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380, 345-347
- (Cameron und Landreth 2010) Cameron B, Landreth GE (2010): Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 37, 503-509
- (Chen et al. 2006) Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho EH, Lockett S, Dunlop NM, Wang JM (2006): Activation of Toll-like Receptor 2 on Microglia Promotes Cell Uptake of Alzheimer Disease-associated Amyloid β Peptide. *J Biol Chem* 281, 3651-3659
- (Combrinck et al. 2002) Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C (2002): Peripheral Infection evokes exaggerated Sickness Behaviour in pre-clinical Murine Prion Disease. *Neuroscience* 112, 7-11
- (Combs et al. 1999) Combs CK, Johnson DE, Cannady SB, Lehman TM, Landreth GE (1999): Identification of Microglia Signal Transduction Pathways Mediating a Neurotoxic Response to Amyloidogenic Fragments of β -Amyloid and Prion Proteins. *J Neurosci* 19, 928-939

- (Combs et al. 2001) Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE (2001): β -Amyloid Stimulation of Microglia and Monocytes Results in TNF α -Dependent Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 21, 1179-1188
- (Cunningham et al. 2005) Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH (2005): Central and Systemic Endotoxin Challenges Exacerbate the Local Inflammatory Response and Increase Neuronal Death during Chronic Neurodegeneration. *J Neurosci* 25, 9275-9284
- (Cunningham et al. 2009) Cunningham C, Campion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JFC, Deacon RMJ, Rawlins JNP, Perry VH (2009): Systemic Inflammation Induces Acute Behavioral and Cognitive Changes and Accelerates Neurodegenerative Disease. *Biol Psychiatry* 65, 304-312
- (Definiens 2009) Definiens AG (2009): Definiens Developer XD1.2 Reference Book 1.2.0, 160-161
- (Definiens 2010) Definiens AG (2010): Definiens XD. Elektronisches Dokument. DATA SHEET (DS-0012-02-190110). [Zugriff: 03.06.2010, http://www.definiens.com/definiens-xd-for-life-sciences_170_7_10.html]
- (Deshpande et al. 2006) Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006): Different Conformation of Amyloid β Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons. *J Neurosci* 26, 6011-6018
- (Doi et al. 2009) Doi Y, Mizuno T, Maki Y, Jin S, Mizoguchi H, Ikeyama M, Doi M, Michikawa M, Takeuchi H, Suzumura A (2009): Microglia Activated with the Toll-Like Receptor 9 Ligand CpG Attenuate Oligomeric Amyloid β Neurotoxicity in in Vitro and in Vivo Models of Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 175, 2121-2132
- (Dunn et al. 2005) Dunn N, Mülle M, Perry VH, Holmes C (2005): Association between Dementia and Infectious Disease: Evidence from a Case-Control Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 19-12, 91-94
- (Ebert et al. 2005) Ebert S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159, 87-96
- (Ebert et al. 2010) Ebert S, Goos M, Rollwagen L, Baake D, Zech WD, Esselmann H, Wiltfang J, Mollenhauer B, Schiebs R, Gerber J, Nau R (2010): Recurrent Sastemic Infection With *Streptococcus pneumniae* Do Not Aggravate the Course of Experimental Neurodegenerative Diseases. *J Neurosci Res* 88, 1124-1136

- (Gatz et al. 2006) Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006): Role of Genes and ,Environments for Explaining Alzheimer Disease. Arch Gen Psychiatry 63, 168-174
- (Gifford und Lohmann-Matthes 1987) Gifford GE, Lohmann-Matthes ML (1987): Gamma interferon priming of mouse and human macrophages for induction of tumor necrosis factor production by bacterial lipopolysaccharide. J Natl Cancer Inst 78, 121-124
- (Giulian et al. 1995) Giulian D, Haverkamp LJ, Li J, Karshin WL, Yu J, Tom D, Li X, Kirrkpatrick JB (1995): Senile Plaques Stimulate Microglia to Release a Neurotoxin Found in Alzheimer Brain. Neurochem Int 27, 119-137
- (Heinrich und Kwetkat 2004) Demenz; in: Innere Medizin 5.Auflage hrsg. v. Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W. Urban & Fischer München, Jena 2004, 1854-1856
- (Hoffmann et al. 2007) Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Lehnardt S, Weber JR (2007): TLR2 Mediates Neuroinflammation and Neuronal Damage. J Immunol 178, 6476-6481
- (Hume et al. 1983) Hume DA, Perry VH, Gordon S (1983): Immunohistochemical Localization of a Macrophage-specific Antigen in Developing Mouse Retina: Phagocytosis of Dying Neurons and Differentiation of Microglia Cells to Form a Regular Array in the Plexiform Layers. J Cell Biol 97, 253-257
- (Iliev et al. 2003) Iliev AI, Stringaris AK, Nau R, Neumann H (2003): Neuronal injury mediated via stimulation of microglial toll-like receptor-9 (TLR9). FASEB J 18, 412-414
- (In ´T Veld et al. 2001) In ´T Veld BA, Ruitenberg A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MMB, Stricker BHC (2001): Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and the Risk of Alzheimer´s Disease. N Engl J Med 345, 1515-1521
- (Kalia 2003) Kalia M (2003): Dysphagia and aspiration pneumonia in patients with Alzheimer´s disease. Metabolism 52 (10 Suppl 2), 36-38
- (Kawai und Akira 2008) Kawai T, Akira S (2008): Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling. Ann N Y Acad Sci 1143, 1-20
- (Kravitz et al. 2009) Kravitz BA, Corrada MM, Kawas CH (2009): Elevated C-reactive protein levels are associated with prevalent dementia in the oldest-old. Alzheimers Dement 5, 318-323
- (Kreutzberg 1996) Kreutzberg GW (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19, 312-318

- (Lehnardt et al. 2002) Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002): The Toll-Like Receptor TLR4 Is Necessary for Lipopolysaccharide-Induced Oligodendrocyte Injury in the CNS. *J Neurosci* 22, 2478-2486
- (Lehnardt et al. 2003) Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003): Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci* 100, 8514-8519
- (Lehnardt et al. 2006) Lehnardt S, Hennecke P, Lien E, Kasper DL, Volpe JJ, Bechmann I, Nitsch R, Weber JR, Golenbock DT, Vartanian T (2006): A Mechanism for Neurodegeneration Induced by Group B Streptococci through Activation of the TLR2/MyD88 Pathway in Microglia. *J Immunol* 177, 583-592
- (Lotz et al. 2005) Loltz M, Ebert S, Esselmann H, Iliev AI, Prinz M, Wiazewicz N, Wiltfang J, Gerber J, Nau R (2005): Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of toll-like-receptor-2 and -4 agonists but antagonizes toll-likereceptor-9-induced inflammation in primary mouse microglia cell cultures. *J Neurochem* 94, 289-298
- (Maeda et al. 2007) Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M, Suhara T (2007): Longitudinal, Quantitative Assessment of Amyloid, Neuroinflammation, and Anti-Amyloid Treatment in a Living Mouse Model of Alzheimer's Disease Enabled by Positron Emission Tomography. *J Neurosci* 27, 10957-10968
- (McKee et al. 2009) McKee AC, Cantu RC, Nowinski CJ, Hedley-Whyte ET, Gavett BE, Budson AE, Santini VE, Lee HS, Kubilus CA, Stern RA (2009): Chronic Traumatic Encephalopathy in Athletes: Progressive Tauopathy After Repetitive Head Injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 709-735
- (Meda et al. 1995) Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L Jr, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F (1995): Activation microgliacells by β -amyloid protein and IFN γ . *Nature* 374, 647-650
- (Mehlhorn et al. 2000) Mehlhorn G, Hollborn M, Schliebs R (2000): Induction of cytokines in glia cells surrounding cortical β -amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *Int J Dev Neurosci* 18, 423-431
- (Mohandas et al. 2009) Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B (2009): Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry* 51, 55-61

- (Møllgård und Saunders 1986) Møllgård K, Saunders NR (1986): The development of the human blood-brain and blood-CSF barriers. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12, 337-358
- (Nee und Lippa 1999) Nee LE, Lippa CF (1999): Alzheimer's disease in 22 twin pairs—13—year follow-up: hormonal, infectious and traumatic factors. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10, 148-151
- (Nguyen et al. 2002) Nguyen MD, Julien J-P, Rivest S (2002): Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?. *Nat Rev Neurosci* 3, 216-227
- (Nguyen et al. 2004) Nguyen MD, Aigle TD, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2004): Exacerbation of Motor Neuron Disease by Chronic Stimulation of Innate Immunity in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurosci* 24, 1340-1349
- (Nimmerjahn et al. 2005) Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005): Resting Microglia Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* 308, 1314-1318
- (Nolte et al. 1996) Nolte C, Möller T, Walter T, Kettenmann H (1996): Complement 5a controls Motility of murine microglia cells in vitro via activation of an inhibitory g-protein and the rearrangement of the actin cytoskeleton. *Neuroscience* 73, 1091-1107
- (Olson und Miller 2004) Olson JK, Miller SD (2004): Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J Immunol* 173, 3916-3924
- (Parant et al. 1995) Parant MA, Pouillart P, Le Contel C, Parant FJ, Chedid LA, Bahr GM (1995): Selective Modulation of Lipopolysaccharide-Induced Death and Cytokine Production by Various Muramyl Peptides. *Infect Immun* 63, 110-115
- (Perry und Gordon 1988) Perry VH, Gordon S (1988): Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 11, 273-277
- (Perry et al. 1985) Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985): Immunohistochemical Localization of Macrophages and Microglia in the adult and developing Mouse Brain. *Neuroscience* 15, 313-326
- (Perry et al. 2003) Perry VH, Newman TA, Cunningham C. (2003): The Impact of systemic Infection on the Progression of Neurodegenerative Disease. *Nat Rev Neurosci* 4, 103-112
- (Perry et al. 2007) Perry VH, Newman TA, Cunningham C. (2007): Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161-167
- (Qin et al. 2002) Qin L, Liu Y, Cooper C, Liu B, Wilson B, Hong JS (2002): Microglia enhance β -amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. *J Neurochem* 83, 973-983

- (Qin et al. 2005) Qin L, Li G, Qian X, Liu Y, Wu X, Liu B, Hong JS, Block ML (2005): Interactive Role of the Toll-Like Receptor 4 and Reactive Oxygen Species in LPS-Induced Microglia Activation. *Glia* 52, 78-84
- (Reed-Geaghan et al. 2009) Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE (2009): CD14 and Toll-like Receptors 2 and 4 Are Required for Fibrillar A β -Stimulated Microglial Activation. *J Neurosci* 29, 11982-11992
- (Ribes et al. 2010) Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2010): Toll-Like Receptor Stimulation Enhances Phagocytosis and Intracellular Killing of Nonencapsulated and Encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by Murine Mikroglia. *Infect Immun* 78, 865-871
- (Rudelli et al. 1982) Rudelli R, Strom JO, Welch PT, Ambler MW (1982): Posttraumatic Premature Alzheimer's Disease Neuropathologic Findings and Pathogenetic Considerations. *Arch Neurol* 39, 570-575
- (Tan et al. 2007) Tan ZS, Beiser AS, Vasan RS, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris TB, Benjamin EJ, Au R, Kiel DP, Wolf PA, Seshadri S (2007): Inflammatory markers and the risk of Alzheimer disease The Framingham Study. *Neurology* 68, 1902-1908
- (Tomowski et al. 2006) Tomowski D, Ehlers M, Michel U, Bohmann G (2006): Segmentierungsverfahren in eCognition. *gi-reports@gif* Objektorientierte Klassifikation von Siedlungsflächen durch multisensorale Fernerkundungsdaten 3 Auflage 1, 41-47; hrsg. v. Institut für Geoinformatik und Fernerkundung (IGF) Osnabrück, [Zugriff: 02.06.2010, http://www.igf.uni-osnabrueck.de/gi_reports_igf3.pdf]
- (Ullrich 2005) Ullrich O (2005): Das Immunsystem des ZNS, molekulare Mechanismen der Balance zwischen Schutz und Schädigung. *Magdeb Wiss J* 1-2, 3-12
- (Vincent und Soille 1991) Vincent L, Soille P (1991): Watersheds in Digital Spaces: An Efficient Algorithm Based on Immersion Simulations. *IEEE T Pattern Anal* 13, 583-598

6.5 Publikationen im Zusammenhang mit dieser Dissertation

Ebert S, Loleit T, Zeretzke M, Bunkowski S, Ribes S, Nau R. Poster: Additiver Mikroglia-vermittelter Neuronenschaden durch Amyloid-beta und bakterielle TLR-Agonisten. 117. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) in Wiesbaden, Germany; April/May 2011.

Ebert S, Loleit T, Zeretzke M, Bunkowski S, Ribes S, Nau R. Poster: Additive microglial-mediated neuronal injury induced by Amyloid-beta and bacterial TLR agonists. 10th International Congress of Neuroimmunology in Sitges/Barcelona, Spain; October 2010

