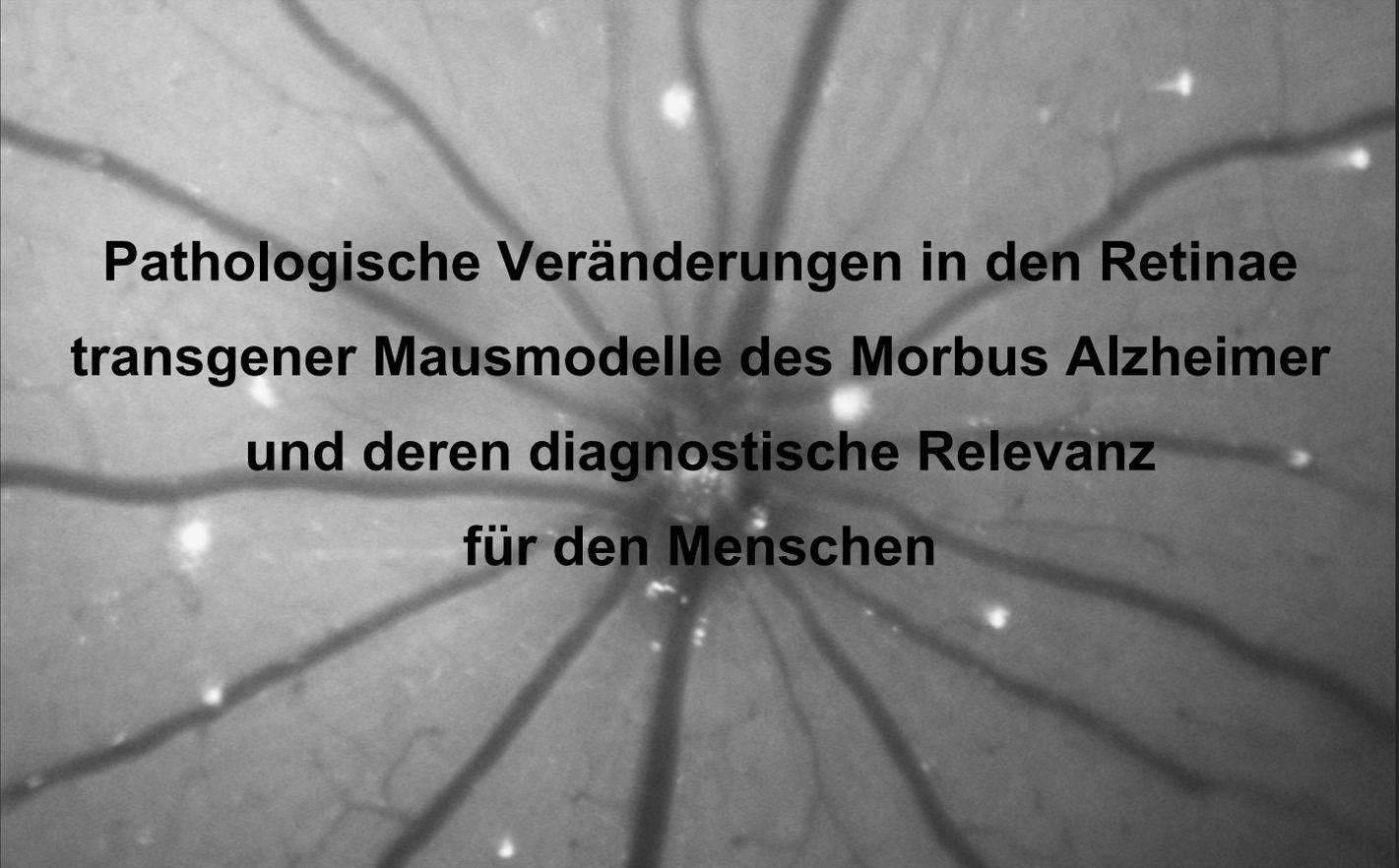


Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Pathologische Veränderungen in den Retinae
transgener Mausmodelle des Morbus Alzheimer
und deren diagnostische Relevanz
für den Menschen**

vorgelegt von
Christian Schön
aus Tirschenreuth

Dezember 2012

Dissertation eingereicht am 13.12.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiss

2. Gutachter: Prof. Dr. George Boyan

Mündliche Prüfung am 17.04.2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Erklärung

Diese Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. Jochen Herms betreut und von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss vor der Fakultät für Biologie vertreten. Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den

Diese Arbeit widme ich meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	13
2	SUMMARY	14
3	EINLEITUNG	15
3.1	Morbus Alzheimer	15
3.1.1	Neuropathologische Veränderungen	16
3.1.1.1	Amyloid-Precursor-Protein, A β -Peptid und A β -Plaques	17
3.1.1.2	Das Tau-Protein, neurofibrilläre Bündel und Tauopathien	20
3.1.2	Diagnose und Früherkennung	22
3.1.3	Pathologische Veränderungen in der Retina beim Morbus Alzheimer	25
3.2	Anatomie des Auges	26
3.2.1	Die Retina	27
3.2.2	Hochauflösende bildgebende Verfahren der Retina	29
3.3	Zielsetzung der Arbeit	31
4	MATERIAL UND METHODEN	33
4.1	Verwendete Chemikalien, Lösungen, Geräte und weitere Hilfsmittel	33
4.2	Mauslinien und Genotypisierungen	36
4.2.1	DeltaE9	37
4.2.2	Tg2576	38
4.2.3	APPPS1	39
4.2.4	3xTg-AD	40
4.2.5	P301S	40
4.2.6	YFPH	42
4.2.7	C57BL/6	43
4.3	Transkardiale Perfusion, Gewebe-Präparation und -Fixation	43
4.4	Humanes Gewebe	44
4.5	Immunhistochemische Methoden	45
4.5.1	Immunhistochemische Färbungen von Retina-Wholamounts und Gehirnschnitten	45
4.5.2	Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten	46
4.6	Mikroskopie	47
4.7	In vivo Untersuchung der Mausretina	47
4.8	Studie mit GSK3-Inhibitoren	50
4.9	Bestimmung der Anregungs- und Emissionsspektren	50

4.10	Statistische Auswertung.....	50
5	ERGEBNISSE	51
5.1	Evaluation der in vivo Untersuchung an der Mausretina	51
5.1.1	cSLO und OCT an der Mausretina.....	51
5.1.2	Autofluoreszenz in der Mausretina.....	52
5.1.3	Evaluation von A β - und Tau-affinen Fluorophoren	53
5.2	Retinale Pathologie in Mausmodellen des Morbus Alzheimer	54
5.2.1	Mausmodelle A β -Pathologie	54
5.2.1.1	Histologische Untersuchungen an Mausmodellen mit A β -Pathologie.....	55
5.2.1.2	In vivo Untersuchungen an Mausmodellen mit A β -Pathologie.....	56
5.2.2	Untersuchungen an Mausmodellen mit hyperphosphoryliertem Tau	57
5.2.2.1	Histologische Untersuchungen an Mausmodellen mit hyperphosphoryliertem Tau ...	58
5.2.2.2	In vivo Darstellung von fibrillären Tau-Aggregaten	59
5.2.2.3	Kinetik der FSB-Bindung an fibrilläre Tau-Aggregate	62
5.2.2.4	Langzeituntersuchung der Formation fibrillärer Tau-Aggregate.....	63
5.2.2.5	Ex vivo Analyse der Bildung fibrillärer Tau-Aggregate	65
5.2.2.6	Langzeituntersuchungen von Effekten therapeutischer Wirkstoffe auf die Formation fibrillärer Tau-Aggregate	66
5.2.2.7	OCT-Langzeituntersuchungen an den Retinae von P301S-Tieren.....	68
5.3	Pathologische Veränderungen in den Retinae von AD- und PSP-Patienten.....	70
6	DISKUSSION	73
6.1	Retinale Aβ-Pathologie in transgenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer.....	74
6.2	Retinale Tau-Pathologie im Mausmodell und deren in vivo Darstellung.....	77
6.3	Übertragbarkeit der murinen Befunde auf ein humanes Diagnoseverfahren	82
6.4	Ausblick für ein Diagnoseverfahren des Morbus Alzheimer über die Retina	84
7	LITERATUR	87
8	ANHANG	103
8.1	Danksagung	103
8.2	Lebenslauf und eigene Veröffentlichungen.....	104

Abbildungsverzeichnis

Titelbild: In vivo Aufnahme einer Retina der P301S-Mauslinie. In weiß erscheinen fibrilläre Tau-Aggregate gefärbt durch den Farbstoff FSB.

Abbildung 1: Neuropathologische Veränderungen im Gehirn eines Alzheimer-Patienten.	17
Abbildung 2: Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP-Prozessierung.	18
Abbildung 3: Tau-Phosphorylierung und Bildung fibrillärer Tau-Aggregate.	21
Abbildung 4: Aufbau des Auges und der Retina	27
Abbildung 5: cSLO-Aufnahmen der gesunden menschlichen Retina.	29
Abbildung 6: cSLO- sowie OCT-Aufnahme einer gesunden menschlichen Retina.	31
Abbildung 7: In vivo Untersuchung der Mausretina	49
Abbildung 8: Imaging-Modi des Multiline OCT an der Mausretina	52
Abbildung 9: Autofluoreszenz in der Mausretina.	52
Abbildung 10: A β - und Tau-bindende Fluorophore.	53
Abbildung 11: Histologische Untersuchungen der Retinae von Mausmodellen, die A β -Pathologie im Gehirn entwickeln.	55
Abbildung 12: In vivo Untersuchungen der Retinae von Mausmodellen, die A β -Pathologie im Gehirn entwickeln.	57
Abbildung 13: Histologische Untersuchungen der Retinae von Mausmodellen, die hyperphosphoryliertes Tau im Gehirn entwickeln.	58
Abbildung 14: Fibrilläre Tau-Aggregate in den Retinae von P301S-Mäusen in vivo und ex vivo.	60
Abbildung 15: Unterscheidung FSB-positiver Zellen von Punkten erhöhter Autofluoreszenz.	61
Abbildung 16: FSB-markierte RGC mit hyperphosphoryliertem Tau in den Retinae von P301S-Mäusen.	62
Abbildung 17: Kinetik der FSB-Bindung an Tau-Aggregate in der Retina einer P301S-Maus.	63
Abbildung 18: Verlauf der Tau-Pathologie in den Retinae von P301S-Mäusen in vivo.	64
Abbildung 19: Verlauf der Tau-Pathologie in der Retina der P301S-Linie ex vivo.	66
Abbildung 20: Verlaufskontrolle von Therapieeffekten auf die Bildung fibrillärer Tau-Aggregate.	67
Abbildung 21: OCT-Langzeituntersuchungen der Retinae von P301S-Mäusen.	69
Abbildung 22: Pathologische Veränderungen in den Retinae von humanen AD- und PSP- Fällen.	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Kits	34
Tabelle 2: Verwendete Lösungen	35
Tabelle 3: Verwendete Geräte und weitere Hilfsmittel	36
Tabelle 4: Verwendete transgene Mauslinien	36
Tabelle 5: Genotypisierung DeltaE9	38
Tabelle 6: Genotypisierung Tg2576	39
Tabelle 7: Genotypisierung APPPS1	39
Tabelle 8: Genotypisierung P301S	41
Tabelle 9: Bestimmung der Zygotie der P301S-Tiere mittels qPCR	42
Tabelle 10: Genotypisierung YFPH	43
Tabelle 11: Untersuchte humane Fälle	44
Tabelle 12: Verwendete Antikörper	46
Tabelle 13: Untersuchte humane Fälle	70
Tabelle 14: Retinale Pathologie der untersuchten Mausmodelle laut Literatur und eigene Befunde	77

Abkürzungsverzeichnis

A β	<i>englisch:</i> A myloid- β peptide
A β ₄₀	<i>englisch:</i> A myloid- β peptide (mit 40 Aminosäuren)
A β ₄₂	<i>englisch:</i> A myloid- β peptide (mit 42 Aminosäuren)
AD	<i>englisch:</i> A lzheimer's d isease
ADAM	<i>englisch:</i> A disintegrin and metalloprotease
AICD	<i>englisch:</i> APP intracellular domain
AMD	A ltersbedingte M akuladegeneration
Aph-1	<i>englisch:</i> A nterior p harynx-deficite 1
ApoE4	ϵ 4 -Allel des A polipoprotein E
APP	A myloid- P recursor- P rotein
AS	A minosäure
BACE1	<i>englisch:</i> beta-site APP -cleaving enzyme 1
bp	B asenpaar
BP	B andpassfilter
CSF	<i>englisch:</i> C erebrospinal fluid (Liquor cerebrospinalis)
cSLO	<i>englisch:</i> confocal scanning laser ophthalmoscopy
CT	C omputer T omographie
CT-Wert	<i>englisch:</i> threshold cycle
CTF	C -terminales F ragment
DAB	3,3' - D iaminobenzidin
DMSO	D imethylsulfoxid
DNA	<i>englisch:</i> D esoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	E thylendiamintetraacetat
ERG	E lektroretinogramm
EtOH	Ethanol
FAD	f amiliäre A lzheimer- D emenz
FSB	(<i>E,E</i>)-1-fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene
FTDP-17	frontotemporale D emenz mit P arkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17
GABA	<i>englisch:</i> g amma- A minobutyric acid
GCL	<i>englisch:</i> g anglion cell layer (Ganglienzellschicht)
GSK3	G lykogen S ynthase K inase 3
HRA	H eidelberg R etina A ngiograph
HRP	<i>englisch:</i> H orseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.p.	intraperitoneal
IL-2	<i>Interleukin-2</i>
inf	i nferior
INL	<i>englisch:</i> inner n uclear layer (innere nukleäre Schicht)
IPL	<i>englisch:</i> inner p lexiform layer (innere plexiforme Schicht)
IS	<i>englisch:</i> inner s egments (innere Segmente der Photorezeptoren)
kb	K ilobasen
LP	L angpassfilter
LSM	<i>englisch:</i> laser scanning microscope
MAPT	M ikrotubuli-assoziertes P rotein T au
MCI	<i>englisch:</i> M ild cognitive impairment
MMST	M ini- M ental- S tatus- T est
MRT	M agnetresonanztomographie
MW	M ittelwert
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
μ W	Mikrowatt
NA	n umerische A pertur
nas	n asal
NFT	<i>englisch:</i> neurofibrillary tangle (neurofibrilläre Bündel)
nm	N anometer
NMDA	N - M ethyl- D - A spartat

Verzeichnisse

OCT	<i>englisch:</i> optical coherence tomography (optische Kohärenztomographie)
OLM	<i>englisch:</i> outer limiting membrane (äußere limitierende Membran)
ONL	<i>englisch:</i> outer nuclear layer (äußere nukleäre Schicht)
OPL	<i>englisch:</i> outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht)
OS	<i>englisch:</i> outer segments (äußere Segmente der Photorezeptoren)
p.i.	<i>englisch:</i> post injection
p.o.	per oral
PBS	<i>englisch:</i> phosphate buffered saline
PCR	<i>englisch:</i> polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEN2	<i>englisch:</i> Presenilin enhancer 2
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PHF	<i>englisch:</i> paired helical filament
PI	Postmortalintervall
PIB	Pittsburgh Compound B
PrP	Prion-Promotor
PS	Presenilin
PSP	<i>englisch:</i> progressive supranuclear palsy (progressive supranukleäre Blickparese)
qPCR	quantitative PCR
RGC	<i>englisch:</i> retinal ganglion cell (retinale Ganglienzelle)
RNA	<i>englisch:</i> ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNFL	<i>englisch:</i> retinal nerve fibre layer (retinale Nervenfaserschicht)
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
sAPP	<i>englisch:</i> secreted amyloid precursor protein
SD	<i>englisch:</i> standard deviation (Standardabweichung)
Ser	Serin
SPF	Spezifiziert pathogenfrei
sup	superior
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCRA	<i>englisch:</i> T-cell receptor alpha
temp	temporal
Thr	Threonin
Tm	Schmelztemperatur
U/min	Umdrehungen pro Minute
YFP	<i>englisch:</i> Yellow fluorescent protein

1 Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist die am weitesten verbreitete Form der Demenz mit verheerendem Einfluss auf das Leben der Betroffenen, deren Angehörigen sowie die weltweiten Sozialsysteme. Durch die alternde Gesellschaft gewinnt die Krankheit immer mehr an Relevanz, vor allem da bisher weder die Ursache der Erkrankung bekannt noch hinreichende Therapien etabliert sind. Ein zentrales Problem in der Entwicklung neuer Therapieansätze liegt in dem Fehlen eines verlässlichen, breit einsetzbaren Frühdiagnoseverfahrens. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob ein Nachweis der Alzheimer-typischen Proteinaggregate von A β und Tau in der Retina für ein potentielles Diagnoseverfahren genutzt werden kann. Dabei sollte eine Methode etabliert werden, bei dem eine A β - und Tau-spezifische, fluoreszente Sonde systemisch appliziert und schließlich das gebundene Fluorophor unter Verwendung eines Retina-Scanners detektiert wird. Dieses Verfahren sollte zunächst in Mausmodellen des Morbus Alzheimer etabliert werden, die laut Literaturangaben A β -Plaques (u.a. DeltaE9 und Tg2576) bzw. fibrilläre Tau-Aggregate (P301S) im Gehirn und der Retina entwickeln. Unter Verwendung A β - bzw. Tau-spezifisch bindender Fluorophore (FSB und BSc4090) konnte in vivo kein Nachweis von A β -Plaques in der Retina mehrerer transgener Mauslinien erbracht werden. Begleitende histologische Untersuchungen zeigten ebenfalls keinerlei Anzeichen für A β -Plaques in diesen Retinae, was im Widerspruch zu publizierten Arbeiten steht. In der P301S-Linie gelang hingegen erstmals der in vivo Nachweis von fibrillären Tau-Aggregaten in retinalen Ganglienzellen unter Verwendung des Farbstoffes FSB. Dieser Befund wurde genutzt, um den Verlauf der Pathologie in der Retina der P301S-Linie über mehrere Monate zu verfolgen. Dabei wurde ein kontinuierlicher Anstieg der Anzahl von retinalen Ganglienzellen mit fibrillären Tau-Aggregaten festgestellt. Anzeichen für einen hierdurch bedingten Zellverlust fanden sich allerdings nicht. Diese Methode erlaubte erstmalig die Durchführung nicht-invasiver Langzeitexperimente zur Untersuchung von Wirkstoffen, die eine Bildung fibrillärer Tau-Aggregate verhindern sollen. Mit den verwendeten GSK3-Inhibitoren konnte allerdings kein Effekt beobachtet werden. Parallel zu den Experimenten im Mausmodell wurden histologische Untersuchungen an den Retinae verstorbener Alzheimer-Patienten durchgeführt. Analog zu den Befunden in den Mausmodellen konnten in den Retinae von Alzheimer-Patienten keine A β -Plaques nachgewiesen werden. Zwar wurden Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau in den Retinae der Alzheimer-Fälle nachgewiesen, fibrilläre Tau-Aggregate fanden sich allerdings nicht. Somit kann der in vivo Nachweis fibrillärer Tau-Aggregate in der Retina des P301S-Modells nicht auf die humane Diagnose übertragen werden.

2 Summary

Alzheimer's disease is the most common form of dementia with a severe impact on the daily life of the patients, their families and worldwide social systems. Due to an aging society Alzheimer's disease gains in importance, while the cause of the disease remains obscure and therapeutic interventions are still missing. A main drawback is the absence of a reliable, widely applicable technique for early diagnosis of the disease which is a precondition for the development of novel therapeutic approaches. The main intention of this doctoral thesis was to clarify, if Alzheimer-related protein aggregates of A β and tau in the retina can be used for a potential diagnostic approach. One aim was to establish a system for the detection of A β - or tau-aggregates by administering specific fluorescent probes that can be detected with a retina angiograph. Firstly, this system should be evaluated in transgenic mouse models of Alzheimer's disease that develop A β -plaques (e.g. DeltaE9 and Tg2576) or fibrillar tau-aggregates (P301S) within the brain and retina, according to earlier publications. Using the A β - and tau-specific fluorescent dyes FSB and BSc4090, no A β -plaques within the retinas of the examined transgenic mouse lines could be detected. Consequently, no A β -plaques were found in histological specimens, thereby contradicting to previously published observations. However, tau-aggregates within the retina of P301S mice could be detected in vivo using the fluorophore FSB. This completely new finding was exploited to observe the kinetics of the retinal pathology in P301S mice over several months. Thereby, a continuous increase in the number of retinal ganglion cells containing fibrillar tau aggregates was determined. No signs for an associated nerve cell loss were observed. Furthermore, this method allowed for non-invasive, long-term experiments analyzing the effect of compounds against the formation of fibrillar tau aggregates. However, the tested GSK3-inhibitors had no effect on the continuous aggregation of tau-aggregates within the retinas of P301S mice. Additionally, the retinas of Alzheimer's patients were histologically examined. Consistently with the findings in the retinas of the transgenic mouse models, no A β -plaques could be observed in the retinal specimens of human Alzheimer's patients. Although deposits of hyperphosphorylated tau could be detected within these retinas, no signs for fibrillar tau aggregates were observed. Therefore, the demonstrated technique for the in vivo detection of fibrillar tau aggregates in the P301S mouse model cannot be translated to human diagnosis.

3 Einleitung

Man sagt „Die Augen sind das Tor zur Seele“ – wissenschaftlich plakativ würde man jedoch viel mehr von einem „Fenster zum Gehirn“ sprechen. Diese Metapher bezieht sich vor allem auf die menschliche Retina, den für optische Verfahren am leichtesten zugänglichen Bereich des zentralen Nervensystems. Auf dieser Eigenschaft des menschlichen Auges beruhen neuartige Ansätze, die Veränderungen im Gehirn nicht-invasiv über die Retina darstellen wollen. Solche Verfahren wären in der Medizin von höchster Relevanz, insbesondere für die Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Alzheimer.

3.1 Morbus Alzheimer

1901 begegnete Alois Alzheimer (1864-1915) seiner heute bekanntesten Patientin: Auguste Deter. Die damals 51-Jährige hatte die Aufmerksamkeit des Psychiaters und Neuropathologen geweckt, da sie schon in verhältnismäßig jungem Alter ein Bild kompletter geistiger Verwirrung zeigte. Damals gab Alzheimer dieser Symptomatik den Namen "Die Krankheit des Vergessens". Als Auguste Deter 1906 an einer Blutvergiftung verstarb, nutzte Alzheimer die Gelegenheit ihr Gehirn histologisch zu untersuchen und beschrieb erstmals die charakteristischen Veränderungen einer Patientin, die nach unserer heutigen Auffassung an Morbus Alzheimer gelitten hatte (Alzheimer, 1907).

Heutzutage ist die Alzheimer-Demenz (AD) die am weitesten verbreitete neurodegenerative Erkrankung. Altersbedingt ist die Krankheit für 50 - 75 % aller Demenz-Fälle verantwortlich (Plassman et al, 2007). Die Relevanz dieser Erkrankungen zeigt sich am deutlichsten durch die geschätzten Fallzahlen. So waren 2009 weltweit 35,6 Millionen Menschen von Demenz betroffen. Basierend auf der demographischen Entwicklung, vor allem in Entwicklungsländern, sollen die Fallzahlen bis zum Jahr 2050 auf geschätzte 115,4 Millionen Patienten ansteigen (Prince & Jackson, 2009). Die daraus resultierende Belastung der Sozialsysteme ist nicht minder gravierend. Laut Schätzungen der WHO kosteten Demenzerkrankungen allein im Jahr 2010 eine Summe von 604 Milliarden US\$ (Wimo & Prince, 2010).

Das Krankheitsbild des Morbus Alzheimer manifestiert sich durch einen progressiven Verlust kognitiver Fähigkeiten, der erheblichen Einfluss auf das Leben der Patienten und ihrer Angehörigen hat. Das frühe Stadium der Erkrankung ist durch Störungen im Kurzzeitgedächtnis sowie im Orientierungs- und Sprachvermögen gekennzeichnet. Im

weiteren Verlauf kommt es unter anderem zum Verlust des Langzeitgedächtnisses sowie zu Depressionen, Psychosen, Verhaltensstörungen und Persönlichkeitsverlust (Borson & Raskind, 1997). Bis heute gibt es keine Therapie, die das Fortschreiten der Alzheimer-Demenz zu verhindern vermag. Zur Behandlung werden unter anderem Wirkstoffe, wie Cholinesterase-Inhibitoren (Donepezil, Rivastigmin, Galantamin) oder NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Memantin) eingesetzt, die allerdings nicht die Ursache bekämpfen, sondern nur den Verlust kognitiver Fähigkeiten verlangsamen (Ballard et al, 2011; Burns, 2009). Oft können die Patienten ihren Alltag nicht mehr alleine bewältigen und werden zum Pflegefall. Im Mittel liegt die Zeit zwischen der Diagnose und dem Ableben der Betroffenen bei neun Jahren. Die Todesursache ist dabei im Regelfall auf Begleitkomplikationen zurückzuführen, wie beispielsweise einer Pneumonie (Samuels & Davis, 1998).

Die Ursache der Erkrankung ist bis heute nicht geklärt und somit wird ein Großteil der Fälle als sporadisch eingestuft. Der größte bekannte Risikofaktor an sporadischem Alzheimer zu erkranken liegt im fortgeschrittenen Alter, weshalb man diese Fälle auch als „late-onset“ bezeichnet. Ab dem Erreichen des 65. Lebensjahres verdoppeln sich die Fallzahlen alle fünf Jahre, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (Ferri et al, 2005; Plassman et al, 2007). Der bestbeschriebene genetische Risikofaktor ist derzeit das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoproteins E (ApoE4), ein Lipoprotein des Cholesterolfstoffwechsels (Corder et al, 1993). Auffälligerweise erkranken jedoch viele Verwandte ersten Grades von Patienten mit sporadischem Alzheimer ebenfalls an dieser Demenzform. Deshalb geht man davon aus, dass bei wesentlich mehr Fällen, die als sporadisch eingestuft werden, eine genetische Veranlagung zu Grunde liegt (Selkoe, 2001).

Im Vergleich zu den sporadischen sind familiäre Fälle der Alzheimer-Demenz (FAD-Fälle) weitaus seltener. Diese aggressiveren Formen der Erkrankung machen in etwa 5 % aller Alzheimer-Fälle aus und können schon ab einem Alter von 40-50 Jahren auftreten, weshalb sie als „early-onset“ eingestuft werden (Zhang et al, 2012). Ursächlich für die familiären Formen des Morbus Alzheimer zeigen sich Mutationen in den Genen von Proteinen, die im Metabolismus des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) eine zentrale Rolle spielen. Dieser wird in Kapitel 3.1.1.1 näher beleuchtet.

3.1.1 Neuropathologische Veränderungen

Schätzungen zufolge enthält das humane Gehirn 120×10^9 Nervenzellen, die jeweils über 10^4 Synapsen miteinander kommunizieren (Herculano-Houzel, 2009). Dieses Netzwerk bildet

die strukturelle und funktionelle Basis von Gehirnaktivität und Gedächtnisleistung. Beim Morbus Alzheimer kommt es vor allem zum Verlust von Neuronen im Cortex und Hippocampus - mit der Folge einer Atrophie dieser Gehirnregionen. Insbesondere dem Hippocampus wird eine zentrale Rolle in der Gedächtnisleistung zugeschrieben, womit sich auch die charakteristischen kognitiven Beeinträchtigungen der Patienten erklären lassen. Weiterhin manifestiert sich der Morbus Alzheimer in den Ablagerungen extrazellulärer A β -Plaques sowie von intrazellulären, neurofibrillären Bündeln (Morrison & Hof, 1997), (Abbildung 1). Die Entstehung dieser charakteristischen Proteinaggregate wird in den nächsten Kapiteln erläutert (Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2).

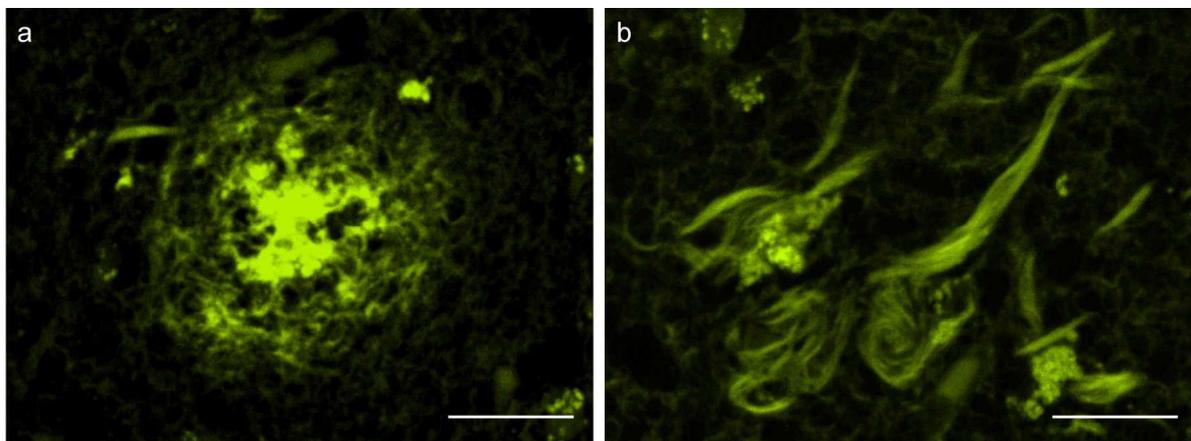


Abbildung 1: Neuropathologische Veränderungen im Gehirn eines Alzheimer-Patienten.

Histologische Gehirnschnitte eines AD-Patienten gefärbt mit dem Fluorophor Thioflavin-S (Gehirnregion: Hippocampus; Patient: männlich, 61 Jahre). **a** A β -Plaques bestehend aus β -Amyloid und **b** neurofibrilläre Bündel bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau. Maßstab: 20 μ m

3.1.1.1 Amyloid-Precursor-Protein, A β -Peptid und A β -Plaques

Die A β -Plaques gehören zu den charakteristischen neuropathologischen Veränderungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten (Abbildung 1 a). Gebildet werden die extrazellulären Proteinablagerungen hauptsächlich aus dem 4,5 kDa großen Amyloid- β -Peptid (A β) (Glenner & Wong, 1984; Masters et al, 1985), welches wiederum ein Spaltprodukt des APP darstellt (Kang et al, 1987).

Insgesamt finden sich acht verschiedene Isoformen des APP-Proteins, die durch alternatives Spleißen entstehen (Zhang et al, 2012). Von diesen Isoformen wird vor allem das APP695 bevorzugt in Neuronen exprimiert (Sandbrink et al, 1994). Strukturell besteht das APP-Protein aus einer großen extrazellulären Domäne (N-terminal), einer hydrophoben

Transmembrandomäne sowie einem kurzen intrazellulären Bereich (C-terminal), (Abbildung 2). Das membranständige APP wird physiologisch auf zwei verschiedenen Wegen proteolytisch gespalten (Abbildung 2): den nicht-amyloidogenen und den amyloidogenen Weg.

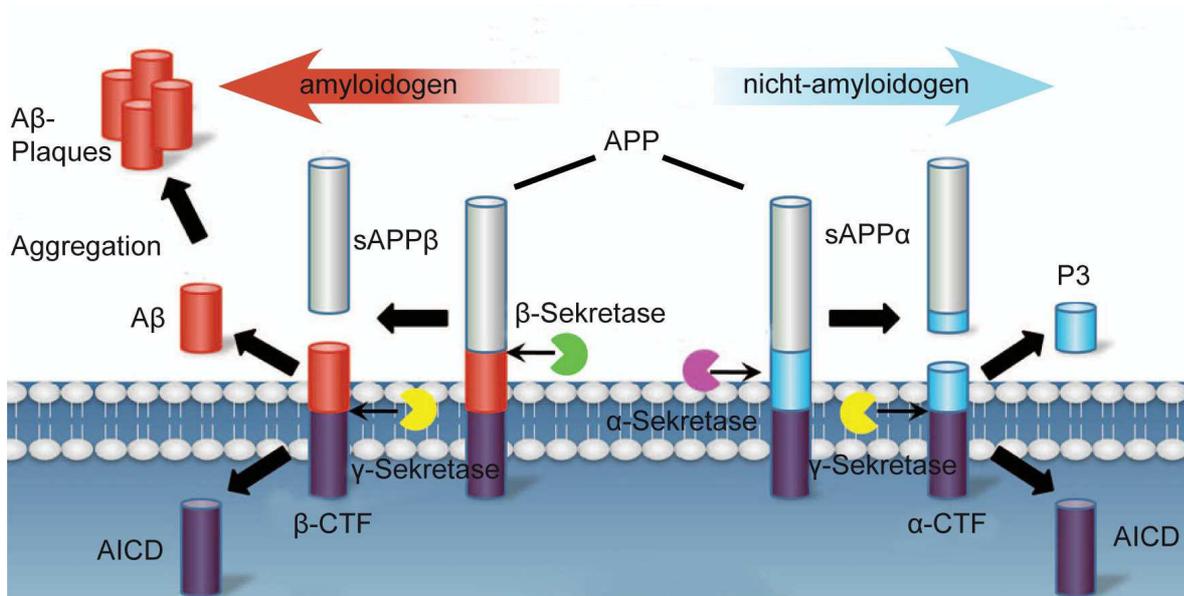


Abbildung 2: Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP-Prozessierung.

APP wird im amyloidogenen Weg sequentiell durch die β - und γ -Sekretase proteolytisch geschnitten. Hierdurch kommt es zur Freisetzung von A β -Peptiden, die schließlich zu unlöslichen, fibrillären A β -Plaques aggregieren. Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP durch die α - und γ -Sekretase prozessiert. Die A β -Domäne des APP wurde zur Veranschaulichung der beiden Prozessierungswege in rot (amyloidogen) bzw. blau (nicht-amyloidogen) dargestellt. Beide Arten der Prozessierung werden im Text näher erläutert (Abbildung modifiziert nach Zhou et al, 2011).

Die nicht-amyloidogene Prozessierung verläuft zunächst über eine membrangebundene Protease aus der ADAM-Familie (A disintegrin and metalloprotease), der α -Sekretase (Anderson et al, 1991). Dabei entsteht neben dem weiterhin membranständigen C-terminalen Fragment α -CTF (oder C83) ein großes, lösliches N-terminales Fragment sAPP α (Weidemann et al, 1989). Danach kommt es zu einer weiteren Spaltung des α -CTF durch die γ -Sekretase, wodurch intrazellulär die APP-Domäne AICD (APP intracellular domain) gebildet und das P3-Peptid sezerniert wird, dem bisher keine offenkundige pathologische Relevanz zugeschrieben werden konnte (Haass et al, 1993; Haass et al, 2012). Bei der γ -Sekretase handelt es sich um einen Proteinkomplex, der sich aus mindestens vier verschiedenen Transmembranproteinen zusammensetzt: PS1 (Presinilin 1) bzw. PS2 (Presinilin 2), PEN2 (Presenilin enhancer 2) Aph-1 (Anterior pharynx-deficite 1) und Nicastrin. Obwohl alle diese Bestandteile essentiell für die Aktivität der γ -Sekretase sind,

bilden die Aspartylproteasen PS1 bzw. PS2 die eigentliche katalytische Untereinheit (Haass et al, 2012; Wolfe et al, 1999).

Weitaus wichtiger für die Pathogenese des Morbus Alzheimer stellt sich allerdings die amyloidogene APP-Prozessierung dar. Hierbei wird das APP zunächst durch die β -Sekretase (oder BACE1) innerhalb der extrazellulären Domäne in ein lösliches N-terminales Fragment (sAPP β) und ein C-terminales Fragment β -CTF (oder C99) gespalten (Vassar et al, 1999). Durch eine weitere proteolytische Spaltung des β -CTF über den γ -Sekretase-Komplex entstehen die A β -Peptide sowie die intrazelluläre APP-Domäne AICD. Die produzierten A β -Peptidfragmente weisen dabei eine Länge zwischen 37 und 43 AS auf und liegen generell in löslichen Monomeren oder Oligomeren vor (Haass et al, 2012). Zweitere können zu unlöslichen Amyloidfibrillen aggregieren, welche schließlich den Grundbaustein für die A β -Plaques bilden. Diese fibrillären Aggregate besitzen eine charakteristische β -Faltblatt-Sekundärstruktur, die als Grundvoraussetzung für eine Bindung von β -Faltblatt-affinen Fluorophoren (z.B. Thioflavin-S oder Kongorot) angesehen wird (Sunde et al, 1997), (Abbildung 1). Die gereiften A β -Plaques setzen sich schließlich zu einem Großteil aus A β ₄₀ und A β ₄₂ Peptiden zusammen, wobei vor allem dem A β ₄₂ hydrophobe und amyloidogene Eigenschaften zugeschrieben werden (Burdick et al, 1992). Im humanen Gehirn unterscheidet man generell neuritische (senile) und nicht-neuritische (diffuse) Plaques. Im Gegensatz zu diffusen Plaques sind neuritische Plaques durch einen Amyloid-Kern und dystroph-veränderte Neuriten gekennzeichnet (Selkoe, 2001).

Generell geht man davon aus, dass das Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau des A β -Peptids ein zentraler Bestandteil in der Alzheimer-Pathogenese ist. Die Auswirkungen eines veränderten APP-Metabolismus werden umso deutlicher, wenn man Patienten mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) näher betrachtet. Bedingt durch die Lage des *APP*-Lokus auf Chromosom 21 liegt hier das Gen in einem Triplikate vor. Dies wird als ursächlich für die früh auftretende Alzheimer-Demenz dieser Patienten angesehen (Olson & Shaw, 1969). Mutationen, die sich auf den APP-Metabolismus auswirken, wurden außerdem als Ursache für Fälle von familiärem Alzheimer identifiziert. Bisher konnten 32 Mutationen im *APP*-, 179 im *PS1*- (Chromosom 14) und 14 im *PS2*-Gen (Chromosom 1) identifiziert werden. Innerhalb des *APP* verdichten sich die Mutationen hauptsächlich um die Gensequenz, die für die Schnittstelle der γ -Sekretase im APP-Protein kodiert. Die wohl bekannteste *APP*-Mutation (schwedische Doppelmutation K670N/M671L) befindet sich hingegen nahe der Schnittstelle der β -Sekretase. Die Mutationen in den *PS1*- und *PS2*-Genen sind hingegen in den Bereichen lokalisiert, die die Transmembrandomänen der Proteine kodieren. Im Endeffekt resultieren all diese Mutationen in einer erhöhten Produktion

des weniger löslichen und neurotoxischen A β ₄₂ im Verhältnis zu A β ₄₀ (O'Brien & Wong, 2011).

Begründet auf der Tatsache, dass die gefundenen Mutationen in den Genen von Proteinen des APP-Metabolismus zu FAD führen, wird A β gemeinhin eine zentrale Rolle bei der Alzheimer-Pathogenese zugeschrieben. Bei der weithin anerkannten Amyloid-Hypothese wird davon ausgegangen, dass die Akkumulation von A β den initialen Schritt in der Pathogenese darstellt (Hardy & Selkoe, 2002). Kontrovers diskutiert werden jedoch vor allem die Frage nach der Art der toxischen Spezies (oligomeres oder fibrilläres A β), die Rolle von intrazellulärem und extrazellulärem A β sowie der pathologische Zusammenhang zwischen A β und Tau (Haass, 2010). Weiterhin war die Identifizierung dieser Mutationen ein zentraler Schritt für die Generierung von Mausmodellen der Alzheimer-Demenz. Diese stellen mittlerweile einen Grundbaustein für die Erforschung der neurodegenerativen Mechanismen der Krankheit dar (Duyckaerts et al, 2008).

3.1.1.2 Das Tau-Protein, neurofibrilläre Bündel und Tauopathien

Eine weitere charakteristische Veränderung im Gehirn von Alzheimer-Patienten stellen die sogenannten neurofibrillären Bündel (NFT) dar (Abbildung 1 b). Diese meist intrazellulären Einschlüsse bestehen zu einem Großteil aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Grundke-Iqbal et al, 1986a; Grundke-Iqbal et al, 1986b). Hierbei handelt es sich im physiologischen Zustand um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das im Normalfall hauptsächlich axonal zu finden ist. Dort nimmt es eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung und dem Aufbau der Mikrotubuli ein (Hasegawa et al, 1998; Hong et al, 1998). Im adulten humanen Gehirn finden sich sechs Isoformen des Tau-Proteins, welche durch alternatives Spleißen entstehen. Diese Isoformen unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit von zwei N-terminalen Abschnitten (Exon 2 und 3) sowie einer von vier möglichen Mikrotubuli-Bindungsdomänen (Exon 10). Mit 85 phosphorylierbaren Aminosäureresten unterliegt das Protein einer strengen Regulierung durch Proteinkinasen und Phosphatasen (Hernandez et al, 2009). Eine Kinase in diesem Wechselspiel ist die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), die Tau an 26 Aminosäureresten phosphorylieren kann. GSK3 wird eine zentrale Rolle bei der Hyperphosphorylierung von Tau in der Pathogenese des Morbus Alzheimer zugeschrieben (Hanger et al, 1992; Ishiguro et al, 1993). Speziell die Überexpression der GSK3 β -Isoform im transgenen Mausmodell resultiert in der Hyperphosphorylierung von Tau und dem Verlust von Neuronen (Lucas et al, 2001).

Man nimmt an, dass diese Hyperphosphorylierung der initiale Schritt in einer Kaskade von Ereignissen ist, die zur Aggregation des Tau-Proteins führen (Spires-Jones et al, 2009), (Abbildung 3). Danach bedingt die Hyperphosphorylierung einen Abfall des Tau-Proteins von den Mikrotubuli und führt zu einer Anreicherung innerhalb des somatodendritischen Kompartiments der Nervenzelle. Dort erfährt das Protein weitere Konformationsänderungen und Phosphorylierungen, was letztendlich zu einer Aggregation und der Bildung von NFT und Neuropilfäden führt (Iqbal et al, 2005). Bei Zweitemerem handelt es sich um feine filamentöse Strukturen, die primär in Dendriten zu finden sind. Neben diesen intrazellulären Einschlüssen befinden sich im postmortalen Gewebe von AD-Patienten auch extrazelluläre Tau-Aggregate, sogenannte Ghost-Tangles.

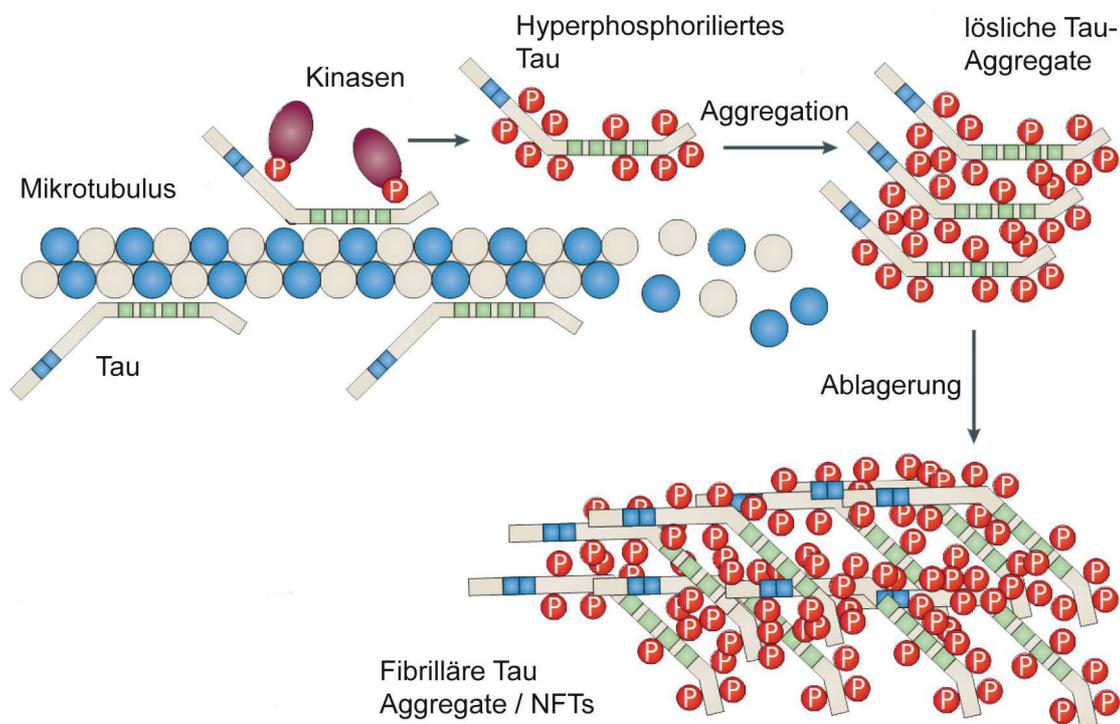


Abbildung 3: Tau-Phosphorylierung und Bildung fibrillärer Tau-Aggregate.

In der Alzheimer-Demenz wird das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau durch verschiedene Kinasen hyperphosphoryliert. Dadurch dissoziiert das Tau-Protein von den Mikrotubuli und diese werden destabilisiert. Das hyperphosphorylierte Tau-Protein aggregiert zunächst zu löslichen und später zu unlöslichen, fibrillären Aggregaten (NFT) (modifiziert nach Götz & Ittner, 2008).

Elektronenmikroskopisch betrachtet, bestehen die NFT überwiegend aus paarig doppelhelikalen Filamenten (PHF) und sogenannten geraden Filamenten (Kidd, 1963). Ähnlich den Amyloid-Fibrillen weisen diese PHF eine charakteristische β -Faltblatt-Sekundärstruktur auf (Berriman et al, 2003). Wie auch bei den A β -Plaques, ist diese

Sekundärstruktur der NFT die Grundvoraussetzung für eine Bindung von β -Faltblatt-affinen Fluorophoren (z.B. Thioflavin-S) (Kuret et al, 2005) (Abbildung 1).

Ablagerungen von hyperphosphorylierten Tau-Aggregaten finden sich weiterhin in einer ganzen Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen namens Tauopathien. Neben Morbus Alzheimer gehören dazu die progressive supranukleäre Blickparese (PSP), kortikobasale Degeneration, Pick-Krankheit, Silberkornkrankheit und die frontotemporale Demenz und Parkinsonismus verknüpft mit Chromosom 17 (FTDP-17) (Goedert, 2004). Mittlerweile konnten zahlreiche Mutationen im *MAPT*-Gen (Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau) identifiziert werden, die zu autosomal-dominanten Formen der FTDP-17 führen. Die Mutationen im *MAPT*-Gen können sich entweder auf den Vorgang des alternativen Spleißens auswirken oder einen direkten Effekt auf die Proteinebene ausüben (Goedert & Jakes, 2005). Bei Letzterem verringern die Mutationen vor allem die Bindungsfähigkeit des Tau-Proteins an die Mikrotubuli. Mutationen, wie die P301S oder P301L, neigen zudem im Vergleich zu wildtypischen Tau in vitro verstärkt zur Aggregation unter Bildung der charakteristischen β -Faltblattstruktur (Iqbal et al, 2005; von Bergen et al, 2001). Während die Mutationen im *MAPT*-Gen unbestreitbar zur Neurodegeneration in FTDP-17 führen, bleibt der exakte Mechanismus der Zelldegeneration bisher ungeklärt. Weitverbreitet ist jedoch die Ansicht, dass die Destabilisierung der Mikrotubuli und der einhergehende gestörte axonale Transport wesentlich zum Untergang der Synapsen und schließlich der Nervenzellen beitragen. Eine weitere Ursache könnte die Anreicherung von Tau-Oligomeren oder NFT innerhalb der Zelle sein, wobei die eigentliche toxische Spezies aktuell kontrovers diskutiert wird (Spires-Jones et al, 2009).

Im Gegensatz zu Morbus Alzheimer kommt es bei den anderen Tauopathien zu keiner vermehrten Bildung von neuritischen A β -Plaques. Nach der verbreiteten Amyloid-Hypothese geht man heute davon aus, dass die Tau-Pathologie beim Morbus Alzheimer sekundär zu den Veränderungen im A β -Metabolismus entsteht (Hardy & Selkoe, 2002). Dementsprechend konnten bei familiären Fällen der Alzheimer-Demenz bisher auch keine Mutationen im *MAPT*-Gen gefunden werden.

3.1.2 Diagnose und Früherkennung

Die Entwicklung neuer Therapeutika gegen Morbus Alzheimer wird wissenschaftlich und politisch mit Nachdruck verfolgt. Wie bei anderen Krankheiten geht auch beim Morbus Alzheimer die Medikation mit einer korrekten Diagnose Hand in Hand. Hierbei ist es

essentiell verschiedene Arten der Demenzen voneinander früh zu differenzieren. Beispielsweise können Medikamente, die aktuell bei Morbus Alzheimer verordnet werden, zu ernsthaften Nebenwirkungen bei Patienten mit frontotemporaler Demenz führen (Götz & Ittner, 2008; Mendez et al, 2007). Ebenso entscheidend ist die Abgrenzung einer Alzheimer-Demenz von möglicherweise behandelbaren Erkrankungen wie Depressionen, Vitaminmangel oder Schilddrüsenunterfunktion. Neben diesen pragmatischen Punkten steht vor allem das Argument, dass die Patienten ein Recht auf die korrekte Diagnose haben, um Vorkehrungen für ihre berufliche, finanzielle und private Zukunft treffen zu können (Prince et al, 2011).

Die Möglichkeiten für eine zuverlässige Frühdiagnose des Morbus Alzheimer sind äußerst eingeschränkt. Zunächst sollte betont werden, dass nach wie vor eine 100 %ige Diagnose nur durch die histologische Aufarbeitung des Gehirns der verstorbenen Person möglich ist (Ballard et al, 2011; Braak et al, 2006). Basierend auf einer aufwendigen Kombination von verschiedenen Methoden nimmt man aktuell an, dass im Bestfall die Diagnose zu 95 % richtig gestellt wird (Mucke, 2009). Allerdings sind diese Schätzungen auf Patienten bezogen, die ein vorangeschrittenes Stadium der Erkrankung aufweisen. Im frühen Stadium der Erkrankung fehlt es hingegen weiterhin an verlässlichen Biomarkern (Mucke, 2009). Weiterhin überlagert die Alzheimer-Pathogenese oft mit normalen Alterungsprozessen und weiteren altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Morbus Parkinson oder der vaskulären Demenz. Hierdurch wird eine korrekte Diagnose zu Lebzeiten der Patienten zusätzlich erschwert (Jellinger, 2006). Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile der wichtigsten Diagnoseverfahren kurz vorgestellt.

Im aktuellen klinischen Alltag wird die Diagnose der Alzheimer-Demenz vor allem über eine Analyse der Patienten- und Familiengeschichte sowie über kognitive Tests wie z.B. dem Mini-Mental-Status-Test (MMST) gestellt. Während die neuropsychologischen Tests eine recht zuverlässige Unterscheidung von Alzheimer-Patienten und nicht dementen Personen ermöglichen (ca. 80 %), gestaltet sich die Abgrenzung zwischen Morbus Alzheimer und anderen Demenzformen als sehr viel schwieriger (Ballard et al, 2011). Diagnosen basierend auf diesen kognitiven Tests können durch weitere Untersuchungen validiert bzw. von anderen Demenzen differenziert werden.

Eine gängige Methode hierbei ist die biochemische Bestimmung der Spiegel von $A\beta_{42}$ und hyperphosphoryliertem Tau im Liquor cerebrospinalis (Nervenwasser, CSF). Erhöhte Spiegel des Tau-Proteins sowie eine Verringerung von $A\beta_{42}$ im CSF weisen auf eine Alzheimer-Demenz hin. Ein Nachteil dieser Methode liegt in der Invasivität der Lumbalpunktion zur Gewinnung des Liquors. Dieses Analyseverfahren birgt dennoch das Potential für eine

Früherkennung des Morbus Alzheimer, wie an Patienten mit MCI (mild cognitive impairment), einer Vorstufe des Morbus Alzheimer, gezeigt werden konnte (Hansson et al, 2006; Mattsson et al, 2009b). Im Moment gibt es allerdings noch erhebliche Abweichungen in den Angaben zur diagnostischen Genauigkeit der Methode und die Analysemethoden bedürfen einer Standardisierung. Um dieses Diagnoseverfahren weiter zu verbessern, werden aktuell auch Marker für Entzündungen oder oxidativen Stress diskutiert (Mattsson et al, 2009a).

Weiterhin stützt man sich vor allem auf bildgebende Verfahren, wie die Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Sowohl CT als auch MRT ermöglichen die Darstellung des Gehirns in konsekutiven Schnittbildern und damit eine Lokalisation von Veränderungen im Gehirn. Gemessen werden dabei die für den Morbus Alzheimer charakteristische Gewebsverluste als Folge der neuronalen Degeneration (Ballard et al, 2011; Fox et al, 1996). Allerdings liegt darin auch der wesentliche Nachteil der CT- und MRT-Messungen. Ein entscheidender Unterschied im Gehirnvolumen kann erst in einem relativ späten Stadium der Krankheit beobachtet werden, in dem bereits ein irreversibler Schaden entstanden ist. Diese Methoden ermöglichen allerdings zuverlässig den Ausschluss anderer Ursachen, wie beispielsweise von Gehirnblutungen oder Tumoren. Beim PET-Imaging wird orts aufgelöst der Zerfall von radioaktiven Molekülen gemessen. Weit verbreitet in der Alzheimer-Diagnose ist dabei der Radioligand ^{18}F -Fluorodeoxyglucose, womit ein Abfall im Glucose-Metabolismus der Alzheimer-Patienten in bestimmten Gehirnarealen beobachtet werden kann. Alternativ ermöglicht PET auch die *in vivo* Darstellung von A β -Ablagerungen durch spezifische Liganden wie das ^{11}C -markierte PIB (Pittsburgh compound B) (Klunk et al, 2004; Nordberg, 2004). Aktuell erlaubt das PET-Imaging zwar die Verfolgung des Krankheitsverlaufs, inwiefern die Methode einen Beitrag zur präsymptomatischen Diagnose leisten kann bleibt jedoch abzuwarten. Generell ist eine Frühdiagnose der Alzheimer-Demenz durch die kostspieligen PET-Untersuchungen sozioökonomisch schwer zu rechtfertigen. Zudem ist diese Technik auf hochspezialisierte Kliniken beschränkt.

Zusammenfassend fehlt es somit vor allem an einem standardisierten Verfahren zur Frühdiagnose der Erkrankung. Eine frühe Diagnose wird jedoch mittlerweile als Grundvoraussetzung für die Etablierung einer erfolgreichen Therapie gesehen. Hierbei gilt es verlässliche Biomarker zu identifizieren, die vor dem Auftreten erster Symptome bereits Auskunft über das Risiko zu erkranken geben. Idealerweise strebt man nach einem kostengünstigen, nicht-invasiven Diagnoseverfahren, das für eine Routineuntersuchung der Risikogruppe von Personen über 65 Jahren geeignet ist. (Barber, 2010).

3.1.3 Pathologische Veränderungen in der Retina beim Morbus Alzheimer

Neben den in Kapitel 3.1 beschriebenen symptomatischen Veränderungen der Alzheimer-Patienten kommt es auch im visuellen System zu Auffälligkeiten. Interessanterweise wurden visuelle Symptome bereits in frühen Stadien der Alzheimer-Demenz beschrieben, noch bevor eine klare Diagnose vorlag (Jackson & Owsley, 2003; Katz & Rimmer, 1989). Diese Sehstörungen äußern sich in verschiedenster Weise. Unter anderem gehören dazu Leseschwierigkeiten, Objektfindungsstörungen, Probleme in der Tiefenwahrnehmung, der Farbwahrnehmung oder der Kontrastempfindlichkeit (Guo et al, 2010).

Man ging lange Zeit davon aus, dass diese Sehstörungen auf die Schädigung des visuellen Cortex oder anderer Verarbeitungszentren des visuellen Systems der Alzheimer-Patienten zurückzuführen sei (Hof & Morrison, 1990; Lewis et al, 1987). Es häuften sich jedoch die Anzeichen, dass hier auch degenerative Prozesse in der Retina eine entscheidende Rolle spielen. So lassen histologische Untersuchungen darauf schließen, dass Bereiche der Retinae von Alzheimer-Patienten auch einer Degeneration unterworfen sind. Konkret konnte ein Verlust retinaler Ganglienzellen (RGC) und ihrer Axone im optischen Nerv beobachtet werden, der sich weiterhin in einer dünneren retinalen Nervenfaserschicht (RNFL) manifestierte (Blanks et al, 1989; Hinton et al, 1986). Hierbei waren vor allem RGC vom M-Typ (magnus für groß) betroffen, wodurch die Störungen in der Kontrastwahrnehmung oder Bewegungsstörungen der Patienten erklärt werden könnten.

Im Gehirn zählen extrazelluläre Ablagerungen von A β -Plaques zu den charakteristischen Merkmalen der Alzheimer-Demenz (siehe Kapitel 3.1.1.1). In der Retina hingegen konnten bis vor kurzem keine extrazellulären A β -Plaques in neuropathologisch diagnostizierten AD-Fällen (Blanks et al, 1989; Hinton et al, 1986) oder Fällen mit klinischer AD Symptomatik (Leger et al, 2011) gefunden werden. Dennoch wurden in einer weiteren histologischen Studie Ablagerungen von APP in den RGC und der RNFL von gealterten Personen beschrieben (Löffler et al, 1995). Neuere Arbeiten zeigten vor allem in den Retinae transgener Mausmodelle der Alzheimer-Demenz Ablagerungen von A β -Plaques (Koronyo-Hamaoui et al, 2011; Koronyo et al, 2012; Liu et al, 2009; Perez et al, 2009). Koronyo-Hamaoui et al (2011) beschrieben zudem erstmals A β -Plaques in den Retinae von verstorbenen Alzheimer-Patienten.

Über das zweite charakteristische Merkmal der Alzheimer-Demenz, hyperphosphoryliertes Tau, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit wenig bekannt. Bisher wurde zwar die altersabhängige Anreicherung des Tau-Proteins in der Retina beschrieben, hyperphosphoryliertes Tau jedoch weder in Kontrollretinae noch in Retinae von Alzheimer-

Patienten gefunden (Leger et al, 2011). In dem Tg2576-Mausmodell der Alzheimer-Demenz, welches *APP* mit der schwedischen Doppelmutation exprimiert, wurde hyperphosphoryliertes Tau in der Retina beschrieben (Liu et al, 2009). Zudem wurden intensive Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau in den Retinae von Mausmodellen der FTDP-17 (P301S und PS19) festgestellt, die eine P301S-Mutationen des *MAPT*-Gens exprimieren (Bull et al, 2012; Gasparini et al, 2011; Magnani et al, 2007).

Darüber hinaus werden immer wieder Hinweise gefunden, dass die Hauptprotagonisten der Alzheimer-Demenz, A β und Tau, auch mit der Neurodegeneration in der Retina im Zusammenhang stehen. So wurden durch histologische Untersuchungen verstärkte Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau in den Retinae von Glaukom-Patienten (Gupta et al, 2008) bzw. A β -Akkumulationen in Drusen von Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration (AMD) nachgewiesen (Johnson et al, 2002; Ohno-Matsui, 2011). Im Kammerwasser von Patienten mit Glaukom oder diabetischer Retinopathie konnten zudem erhöhte Spiegel des Tau-Proteins sowie eine Verringerung von A β_{42} festgestellt werden (Yoneda et al, 2005). Des Weiteren könnte die retinale Pathogenese in verschiedenen Demenzformen auch durch die Aggregation anderer Proteine beeinflusst werden. So wurden beispielsweise Veränderungen in der Verteilung von Synucleinen in den Retinae von Patienten mit AD und Lewy-Körper-Demenz festgestellt (Maurage et al, 2003; Surguchov et al, 2001).

3.2 Anatomie des Auges

Wie kaum ein anderes Lebewesen ist der Mensch auf die Fähigkeit angewiesen aus Lichtreizen Bilder seiner Umwelt zu entwerfen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das Sinnesorgan Auge, dessen Komplexität oft auch mit seiner Störanfälligkeit einhergeht. Das Auge besitzt bei Vertebraten einen einheitlichen Grundaufbau (Abbildung 4 a). Die äußerste Schicht bildet dabei die feste Sklera oder Lederhaut, die im vorderen Bereich in die durchsichtige Cornea (Hornhaut) übergeht. Darunter liegt als weitere Schicht die Uvea, welche im vorderen Abschnitt des Auges aus Iris und Ziliarkörper besteht und im hinteren Bereich die Choroidea (Aderhaut) bildet. Über die Choroidea läuft die Versorgung mit Nährstoffen angrenzender Gewebe. In der Augenninnenseite liegt die Retina, auf die mit Hilfe des dioptrischen Apparats ein verkleinertes, umgekehrtes Abbild der Umwelt geworfen wird. Der dioptrische Apparat selbst setzt sich aus Cornea, Kammerwasser, Linse und Glaskörper zusammen. Durch ihn wird das einfallende Licht gebündelt und in einem Punkt auf die Retina

fokussiert. Die Akkommodation, oder Feineinstellung des Auges auf bestimmte Objekte, wird durch ein Zusammenspiel von Iris, Ziliarkörper, Zonulafasern und Linse erreicht (Moyes & Schulte, 2007).

3.2.1 Die Retina

Die Retina ermöglicht die eigentliche Detektion von Lichtreizen und deren Umwandlung in neuronale Signale. Grob unterscheidet man fünf verschiedene Klassen von Neuronen in der Retina: Photorezeptor-, Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen (Dowling & Boycott, 1966). Mikroskopisch ist die Retina als ein klar geschichtetes Gewebe zu erkennen (Abbildung 4 b, c).

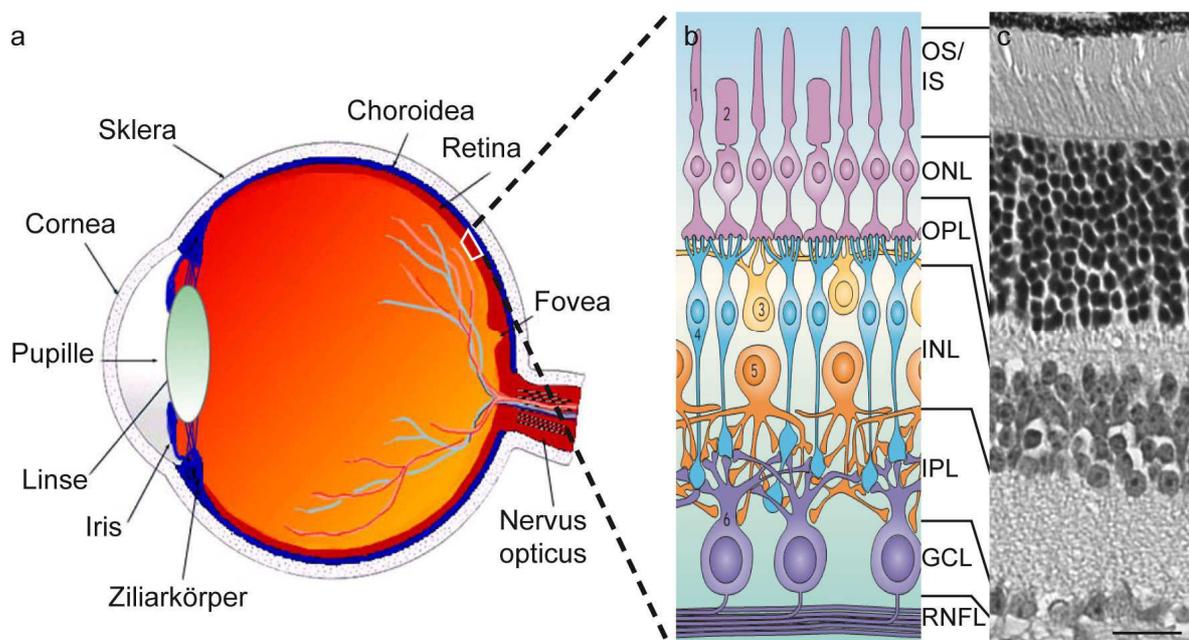


Abbildung 4: Aufbau des Auges und der Retina

a Schematischer Aufbau des Vertebratenauges (modifiziert nach <http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/gross-anatomy-of-the-eye>). **b** Schematischer Aufbau der Retina (Wässle, 2004). OS, äußere Segmente der Photorezeptoren; IS, innere Segmente der Photorezeptoren; ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht; RNFL, retinale Nervenfaserschicht. 1, Stäbchen; 2, Zapfen; 3, Horizontalzellen; 4, Bipolarzellen; 5, Amakrinzellen; 6, Ganglienzellen **c** Histologischer Vertikalschnitt der Retina gefärbt mit Hämatoxylin. Maßstab: 20 µm

Grob betrachtet sind die Somata der verschiedenen retinalen Zelltypen in drei nukleären Schichten angeordnet. Dazwischen liegen die beiden plexiformen Schichten, in denen die

verschiedenen Zelltypen über Synapsen miteinander in Kontakt stehen. Im Detail bildet das retinale Pigmentepithel (RPE) die äußerste Schicht der Retina. Das RPE umschließt die äußeren Segmente der Photorezeptoren (OS), bevor sich die inneren Segmente der Photorezeptoren (IS) anschließen. Die Zellkörper der Photorezeptoren befinden sich schließlich in der äußeren nukleären Schicht (ONL). Diese stehen in synaptischem Kontakt mit den Dendriten der Bipolar- und Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Die innere nukleäre Schicht (INL) setzt sich aus den Zellkörpern von Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen zusammen. In der Ganglienzellschicht (GCL) sind die Somata der Ganglienzellen, aber auch die der displaced Amakrinzellen zu finden. Zwischen den beiden Schichten der INL und GCL liegt die innere plexiforme Schicht (IPL), in der Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen synaptisch verschaltet sind. Die Axone der Ganglienzellen verlaufen in der RNFL und bilden schließlich den Nervus opticus, der über die Papille das Auge verlässt und die Sehinformation an das Gehirn weiterleitet. Anhand der einzelnen Schichten unterscheidet man generell die innere (INL, IPL, GCL und RNFL) und äußere Retina (RPE, OS, IS, ONL, OPL).

Die Rezeption der Lichtreize erfolgt in den Außensegmenten der Photorezeptoren, in denen sich die Sehpigmente in dicht übereinander gestapelten Membranscheiben befinden. Man unterscheidet zwei Arten von Photorezeptoren. Dies sind zum einen die Stäbchen, die mit ihrer höheren Lichtempfindlichkeit für das Dämmerungs- und Nachtsehen zuständig sind (skotopisches System) und zum anderen die Zapfen, die für das Tages- und Farbsehen verantwortlich sind (photopisches System). Das Sehpigment der Stäbchen ist einheitlich das Rhodopsin, Zapfen hingegen können je nach Tierart mehrere verschiedene Sehpigmente aufweisen. So besitzen zum Beispiel Mäuse als Dichromaten zwei verschiedene Zapfentypen mit Absorptionsmaxima bei 360 nm (blau) und 510 nm (grün) (Jacobs et al, 1991). Kommt es zur Absorption von Lichtquanten durch ein Sehpigment, wird eine biochemische Signalkaskade in Gang gesetzt, die den Lichtreiz verstärkt und in ein elektrisches Rezeptorpotential umwandelt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Phototransduktion (Stryer, 1986). Im Dunkeln schüttet die Photorezeptorzelle kontinuierlich den Neurotransmitter Glutamat aus. Bei Lichteinfall wird die Photorezeptorzelle hyperpolarisiert, was in einer verringerten Glutamatfreisetzung resultiert. Über die Bipolarzellen und deren Synapsen wird dieses Signal durch den Neurotransmitter Glutamat bis zu den Ganglienzellen weitergeleitet. Neben dieser vertikalen Erregungsleitung von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen bis hin zu den Ganglienzellen, existiert in der Retina zudem eine horizontale Signalverarbeitung. Dabei wird das glutamaterge Signal der vertikalen Erregungsleitung durch laterale Inhibition moduliert. In der OPL geschieht dies

durch GABAerge Horizontalzellen, in der IPL durch glycinerge oder GABAerge Amakrinzellen (Peichl, 1992; Wassle & Boycott, 1991).

3.2.2 Hochauflösende bildgebende Verfahren der Retina

Der optische Apparat des Auges ermöglicht die nicht-invasive Untersuchung von retinalen Strukturen. Bei der klassischen Funduskopie (Augenspiegelung) wird der Augenhintergrund beleuchtet und das reflektierte Bild mit einer Lupe betrachtet. Dieses Verfahren ist seit der Erfindung des Augenspiegels 1851 in der ophthalmologischen Diagnostik etabliert. In der Diagnose und den Verlaufsuntersuchungen von Retinaerkrankungen, wie dem Glaukom oder der AMD, sind moderne Untersuchungsmethoden allerdings nicht mehr wegzudenken. Zwei dieser Standardmethoden, die auch in Kombination eingesetzt werden können, sind die konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie sowie die optische Kohärenztomographie (Helb et al, 2010a).

In den 1980ern erstmals vorgestellt, hat sich die konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie (cSLO) zu einer klinischen Standardmethode zur hochauflösenden Darstellung des Augenfundus entwickelt (Webb et al, 1987).

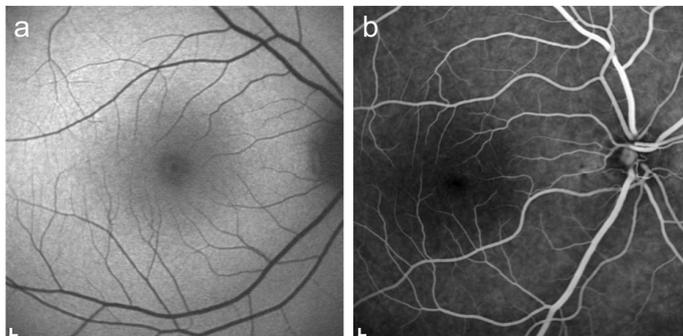


Abbildung 5: cSLO-Aufnahmen der gesunden menschlichen Retina.

a Fundusautofluoreszenz im Bereich der Fovea centralis und **b** Angiographie mit Fluorescein-Na. Zur Verfügung gestellt von der Firma Heidelberg Engineering. Maßstab: 200 μ m (links unten)

Dabei wird die Retina mit Laserlicht vertikal und horizontal abgetastet. Das reflektierte Licht passiert eine Lochblende, wodurch nur das Signal aus der Fokalebene von einem Sensor detektiert wird. Durch dieses konfokale System wird im humanen Auge eine isotrope Auflösung von 5 μ m erreicht. Die weitverbreitete Untersuchung der Fundusautofluoreszenz mittels cSLO liefert wertvolle Anhaltspunkte für die Diagnose und Phänotypisierung von Netzhauterkrankungen (Abbildung 5 a). Die Fundusautofluoreszenz beruht dabei im Wesentlichen auf der Fluoreszenz von angereicherten Lipofuszin innerhalb der RPE-Zellen. Veränderungen der topographischen Intensitätsverteilung der Fundusautofluoreszenz sind

charakteristisch für verschiedene Erkrankungen, wie der AMD oder dem Makulaödem (Bindewald et al, 2005). Eine weitere klassische Anwendung des cSLO liegt in der Fluoreszein- oder Indozyaningrün-Angiographie (Abbildung 5 b). Die Dokumentation des Anflutens und der Verteilung der verwendeten Kontrastmittel erlaubt Rückschlüsse bei der Diagnose von Augenerkrankungen, wie der AMD oder diabetischen Retinopathie (Hassenstein & Meyer, 2009).

Die Optische Kohärenztomographie (OCT) ermöglicht eine nicht-invasive Darstellung des Querschnitts von biologischem Gewebe (Huang et al, 1991). Ein Vorteil gegenüber anderen Untersuchungsmethoden liegt in der großen Eindringtiefe der OCT (2-3 mm) bei gleichzeitig hoher Auflösung (4-6 μm axial, 14 μm transversal) (Wolf-Schnurrbusch et al, 2009). Im Vergleich zu Ultraschall, MRT oder CT besitzt die OCT sogar eine 10- bis 100-fach bessere Auflösung (Fujimoto, 2003). Wegen ähnlicher zugrunde liegender Prinzipien wird die OCT oft mit Ultraschall verglichen. Allerdings wird das zu untersuchende Gewebe in der OCT nicht mit Schall, sondern mit nahinfrarotem Licht (800 – 900 nm) abgetastet. Wegen der ungleich höheren Geschwindigkeit des Lichts können optische Echos allerdings nicht, wie bei Ultraschall, direkt elektronisch detektiert werden. Deshalb beruhen die Messungen im OCT auf dem Prinzip der Michelson-Interferometrie. Dabei wird das Laserlicht durch einen Strahlteiler geleitet und gleichermaßen auf die Netzhaut (Messarm) und einen Referenzspiegel (Referenzarm) projiziert. Das reflektierte Licht aus dem Messarm und dem Referenzarm bildet schließlich durch Überlagerung ein Interferenzspektrum. Bei der heute gängigen Spectral-Domain-OCT (SD-OCT) wird das aufgenommene Interferenzsignal mittels eines Spektrometers erfasst und über eine Fourier-Analyse die Intensitäts- und Laufzeitunterschiede des reflektierten Lichts ermittelt. Die endgültige Darstellung der Retina beruht auf der unterschiedlichen Reflektivität der einzelnen Netzhautschichten, die wiederum durch deren Brechungsindizes zu Stande kommt. Im OCT-Bild erscheinen diese in verschiedenen Graustufen oder auch Falschfarben. Strukturen mit hoher Reflektivität, wie z.B. die Nervenfaserschicht, werden dunkler abgebildet als Strukturen niedrigerer Reflektivität, wie z.B. die Zellkörper der ONL und INL. Klinisch ermöglicht das OCT Aussagen über diagnostizierbare Veränderungen sowie zum Therapieverlauf von verschiedensten Retinaerkrankungen zu treffen. Prominente Beispiele sind hierbei die Glaukomdiagnostik, bei der mittels OCT die Nervenfaserschichtdicke und Papillenexkavation gemessen werden kann oder auch die AMD-Diagnostik, bei der das OCT zur Untersuchung der Netzhautdicke und der Bildung von Drusen verwendet wird (Helb et al, 2010b).

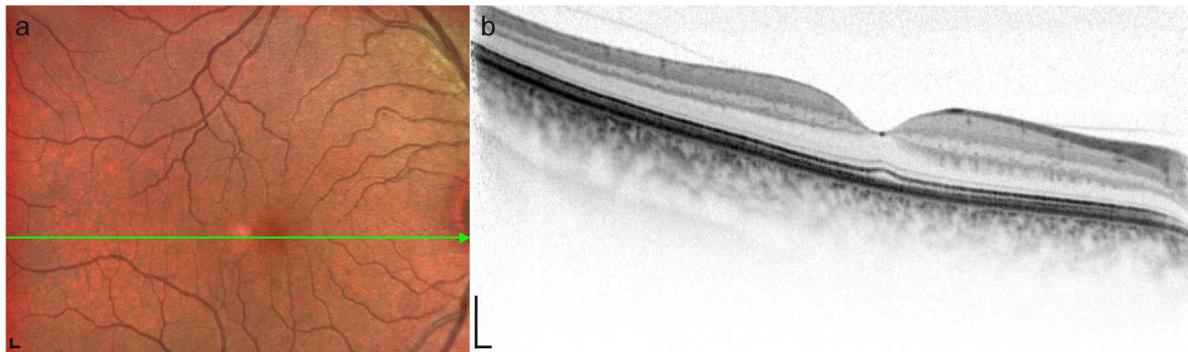


Abbildung 6: cSLO- sowie OCT-Aufnahme einer gesunden menschlichen Retina.

a cSLO-Aufnahme im Bereich der Fovea centralis. **b** Mittels OCT können in vivo vertikale Schnittbilder der Retina abgebildet werden. Die Position des OCT-Scans wird in **a** durch den grünen Pfeil verdeutlicht. Zur Verfügung gestellt von der Firma Heidelberg Engineering. Maßstab: 200 μm (links unten)

In der Klinik werden des Öfteren Retina-Scanner verwendet, die sowohl cSLO als auch OCT in sich vereinen (Abbildung 6). Im Gegensatz zu konventionellen Funduskameras ermöglicht die geringe Breite des Laserstrahls dieser Scanner auch die Untersuchung der Retina in kleinen Nageraugen (Fischer et al, 2009; Seeliger et al, 2005).

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher geschilderten diagnostischen Verfahren und Ansätze zur Alzheimer-Diagnose und -Früherkennung sind aktuell noch unbefriedigend oder unausgereift. Daraus ergibt sich ein Bedarf an neuen Diagnoseverfahren, die vor allem zu frühen Zeitpunkten der Demenz ansetzen. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwiefern ein Diagnoseverfahren über den Nachweis von A β -Plaques oder hyperphosphoryliertem Tau in der Retina zu realisieren ist. Hierzu wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob transgene Mausmodelle der Alzheimer-Demenz diese pathologischen Proteinablagerungen in der Retina aufweisen. Parallel hierzu sollte eine Methode zur in vivo Darstellung dieser Proteinaggregate im Mausmodell basierend auf A β - bzw. Tau-spezifischen, fluoreszenten Sonden etabliert werden. Neben diesen Experimenten an den transgenen Mausmodellen sollte an Hand histologischer Untersuchungen geklärt werden, inwiefern ein Nachweis von A β oder Tau in der Retina auf den Menschen übertragbar ist.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Chemikalien, Lösungen, Geräte und weitere Hilfsmittel

Chemikalie oder Kit	Firma / Produktnummer
1,2-Propandiol	Sigma / 398039
Agarose	Serva / 11404
Ameisensäure	VWR / 8.22254.1000
Augen- und Nasensalbe	Bepanthen
Barney's Best Creamy Peanut Butter	Tengelmann
Biotin-Blocking Kit	Life Technologies / E21390
BSc4090	Boris Schmidt (Boländer et al, 2012)
Casein I	Applied Biosystems/ T2015
DMSO	Sigma / D4540
DNA-Marker (1 kb)	Peqlab / 25-2030
EDTA	Sigma / ED4SS
Essigsäure (100 %)	Merck / 1.00063.2500
Ethanol	Staub
Fluorescence Mounting Medium	Dako / S302380-2
Formalin (4 %)	Apotheke
FSB	Merck / 344101
Gel Loading Buffer	Sigma / G2526-5ML
Hot Master Mix (2,5 x)	VWR / 220041
I-View DAB Detection Kit	Ventana / 760-091
KCl	Merck / 1.04936
Ketamin 10 % (100 mg/ml)	WDT
KH ₂ PO ₄	Merck / 4873.1000
Mausalbumin	Merck / 126674
Methocel 2 %	OmniVision
Methoxy-X04	Boris Schmidt (Klunk et al, 2002)
NaCl	VWR / 1.06404.1000
NaCl-Lösung, isotonisch (0,9 %)	Braun / 3710647
NaOH	Merck / 1.09137.1000
Na ₂ HPO ₄	Roth / P030.2
NP12 / Tideglusib	Noscira
NP103	Noscira
Paraffin	Merck / 1.15161.9025
Paraformaldehyd	VWR / 28794.295
PEG300	AppliChem / A5537,1000
peqGold Tissue DNA Mini Kit	Peqlab / 12-3396-02
Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems / 4368706
Primer	MWG Eurofins
Rompun 2 % (Xylazin)	Bayer HealthCare
Sybr-Gold	Life Technologies / S114940
Thioflavin-S	Sigma / T1892-25mg
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma / S4641

Tris-Base	Sigma / T1503-1KG
Triton-X	Sigma / T9284
Tropicamid Augentropfen	Mydriadicum Stulln
TSA Kit	Life Technologies / T20936
Tween-20	Sigma / P1379
Xylol	Staub

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Kits

Lösung	Herstellung
Agarose-Gel (1,5%)	2,3 g Agarose 3 µl Sybr-Gold 150 ml 1 x TAE-Puffer
BSc4090 (1,35 mM)	0,5 mg in 1 ml PEG300 lösen
BSc4090 (5,4 µM)	0,5 mg in 1 ml PEG300 lösen 1:250 in 50 % EtOH verdünnen
Casein I-Block	1 g Casein I 50 ml PBS 0,5 ml Tween
Citratpuffer (pH 6.0)	2,6 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1 l Aqua dest
FSB (2,38 mM)	5 mg FSB in 500 µl DMSO lösen 1:10 in PBS mit 2% Mausalbumin verdünnen
FSB (23,8 µM)	5 mg FSB in 500 µl DMSO lösen 1:1000 in 50 % EtOH verdünnen
Ketamin/ Xylazin Narkose	4 ml Ketamin (100 mg/ml) 1 ml Xylazin (20 mg/ml) 24 ml isotonische NaCl-Lösung (0,9 %)
Mausalbum (2 %)	25 mg Mausalbumin in 1,25 ml PBS lösen
Methoxy-X04 (29 µM)	2 mg Methoxy-X04 in 100 µl DMSO lösen. 450 µl 1,2-Propandiol und 450 µl PBS zugeben 1 Tropfen 1 M NaOH 1:500 in 50 % EtOH verdünnen
NaOH 4 M	160 g NaOH in 1 l Aqua dest
Paraformaldehyd (4 %)	1 g PFA 25 ml PBS 2 Tropfen 4 M NaOH bei 70 °C lösen und abfiltrieren
PBS (10 x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ In 1 l Aqua dest
TAE-Puffer (50 x)	121 g Tris-Base

	28,5 ml Essigsäure (100%) 9,31 g EDTA In 500 ml Aqua dest
Thioflavin-S (1 %)	10 mg Thioflavin-S 1 ml Aqua dest filtrieren

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsfirma / Produktnummer
Ausgießstation EC350	Microm
Benchmark Färbeautomat	Ventana
Deckglas	VWR / 631-0146
Gefäßschere	FST / 15000-00
Gelkammer SGU-030T-02	C.B.S. Scientific
Hypercenter Excelsior	Thermo Fisher Scientific
Kamera ColorView Soft Imaging System	Olympus
Kamera Power Shot G1 Digital	Canon
Kanüle 27 G x $\frac{3}{4}$	VWR / 612-0138
Konfokales Mikroskop LSM 510	Zeiss
Kontaktlinse	Roland Consult / Eigenbau
Küvette Quartz SUPRASIL	PerkinElmer
LED-Lichtquelle KL1500	Schott
Lichtmikroskop BX50	Olympus
Light Cycler 480	Roche
LS55 Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer Instruments
Maushalterung	Eigenbau
Mikrotom SM 2000R	Leica
Multiline OCT	Heidelberg Engineering
Nano-Drop ND1000	ThermoFisher Scientific
Objektiv 20 x / 0,4 NA / Plan-Neofluar	Zeiss / 441341
Objektiv 40 x / 0,75 NA / UPlanFI	Olympus / UB527
Objektiv 40 x / 1,3 NA / Oil / Plan-Achromat	Zeiss / 440842
Objektträger Superfrost Plus	VWR / 631-9483
Perfusionskanüle 27G short	Helpi-Medical / ABB600627
Pinzette adson	FST / 11006-12
Pinzette gerade	FST / 91150-20
Pinzette gerade hart	FST / 11223-20
Pinzette gebogen	FST / 91197-00
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schere	FST / 91460-11
Schüttler KM-2 AKKU	Edmund Bühler
Spaltlampenlupe 78D	Volk
Thermoblock	Eppendorf
Thermocycler Master Cycler	Eppendorf
Software cellD Version 1.5	Olympus Software Imaging GmbH
Software Heyex Version 5.1	Heidelberg Engineering

Software LSM 510 Version 4.2	Zeiss
Software SigmaStat Version 3.5	Systat Software GmbH
Spannungsregler E143	Consort
Spritzen	VWR / 613-3908
Stereomikroskop SZ51	Olympus
UV-Lampe 3 UV Transilluminator	LTF Labortechnik
Vibrator VT1000E	Leica
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge 5804R	Eppendorf

Tabelle 3: Verwendete Geräte und weitere Hilfsmittel

4.2 Mauslinien und Genotypisierungen

Alle Mauslinien wurden in der zentralen Tierhaltung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung unter SPF-Bedingungen verpaart und gehalten. Die verwendeten Mausmodelle sind in Tabelle 1 zusammengefasst und in den Kapiteln 4.2.1 - 4.2.6 ausführlich beschrieben.

Linie	Transgen	Promotor	Pathologie im Gehirn	Pathologie in der Retina
DeltaE9	<i>APP</i> (K595N/M596L) <i>PS1</i> (PS1dE9)	PrP	A β -Plaques ab 6 M (Jankowsky et al, 2004)	A β -Plaques ab 2 M (Koronyo-Hamaoui et al, 2011) A β -Plaques ab 12 M (Perez et al, 2009)
Tg2576	<i>APP</i> (K670N/M671L)	PrP	A β -Plaques ab 12 M (Hsiao et al, 1996)	A β -Plaques ab 14 M (Liu et al, 2009)
APPPS1	<i>APP</i> (K670N/M671L) <i>PS1</i> (L166P)	Thy1	A β -Plaques ab 2 M (Radde et al, 2006)	keine Literaturangaben
3xTg-AD	<i>APP</i> (K670N/M671L) <i>PS1</i> (M146V) <i>MAPT</i> (P301L)	Thy1	A β -Plaques und hyperphosphoryliertes Tau ab 15 M (Oddo et al, 2003)	keine Literaturangabe
P301S	<i>MAPT</i> (P301S)	Thy1	hyperphosphoryliertes Tau ab 3 M (Hampton et al, 2010)	hyperphosphoryliertes Tau ab 6 W (Gasparini et al, 2011)
YFPH	<i>YFP</i>	Thy1	keine Pathologie	keine Pathologie

Tabelle 4: Verwendete transgene Mauslinien

Die Bestimmung des Genotyps der einzelnen Mäuse erfolgte über die Amplifikation für die Mauslinie spezifischer Gensequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al, 1988). Hierfür wurde die genomische DNA der einzelnen Tiere aus Schwanzbiopsien mit

dem peqGold Tissue DNA Mini Kit isoliert, das alle im Folgenden aufgeführten Lösungen und Säulen enthält. Konkret wurde hierfür die gewonnene Schwanzbiopsie in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, 400 µl Lysis Buffer T, 20 µl Proteinase K und 15 µl RNase (20 mg/ml) zugegeben, der Ansatz kurz gevortext und über Nacht bei 50 °C in einem Schüttel-Thermoblock inkubiert. Am nächsten Tag wurden die nicht verdauten Bestandteile abzentrifugiert (10.000 U/min, 1 min) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurde 400 µl DNA-Binding Buffer gegeben, kurz gevortext, und anschließend der gesamte Ansatz auf eine PerfectBind DNA Säule geladen. Diese wurde für 1 min bei 10000 U/min abzentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Danach wurde auf die Säule 2 x 500 µl DNA-Wash Buffer gegeben, bei 10000 U/min 1 min abzentrifugiert und der Säulendurchfluss erneut verworfen. Zum Trocknen der Säulenmembran wurde diese nochmals bei 10000 U/min für 2 min abzentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Elution Buffer auf die Säulenmatrix, eine 3 min Inkubation bei RT und einen letzten Zentrifugationsschritt für 1 min bei 6000 U/min. Die isolierte DNA wurde bei 4 °C gelagert. Zur eindeutigen Genotypisierung mittels PCR wurden künstliche Oligonukleotide (Primer) derart designed, dass nur Abschnitte aus dem für die Mauslinie spezifischen Transgen amplifiziert wurden. Die Primer, PCR-Ansätze und PCR-Programme sind in den Tabellen 1-7 beschrieben. Generell wurden immer zusätzliche Wildtypkontrollen sowie Positivkontrollen von Tieren mitgeführt, von denen der Genotyp bereits gesichert war.

Nach der PCR erfolgte die analytische Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese. Hierzu wurden die DNA-Amplifikate im Verhältnis 1:5 mit 6 x Gel Loading Buffer versetzt und in die Taschen eines Agarose-Gels (1,5 %) pipettiert. In einer mit TAE-Puffer gefüllten Gelkammer wurden anschließend die DNA-Fragmente bei einer Spannung von 80 mV über 2 h 30 min aufgetrennt. Die anschließende Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des im Gel enthaltenen Farbstoffs Sybr-Gold, der an die Nukleinsäuren bindet. Das Sybr-Gold wurde anschließend mit UV-Licht angeregt und die Fluoreszenz mit der Power Shot G1 Digital Kamera aufgenommen. Die so detektierten DNA-Banden wurden zur Größenbestimmung mit dem zusätzlich aufgetragenen DNA-Marker (1 kb) verglichen.

4.2.1 DeltaE9

Die Linie B6.Cg-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/J (Jankowsky et al, 2004), im Folgenden als DeltaE9 bezeichnet, wurde über Jackson Laboratories (Maine; USA) bezogen. Diese Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund exprimieren unter der Kontrolle des Prion-Promotors (PrP) *APP* mit

der schwedischen Doppelmutation (K595N/M596L) sowie eine *PS1*-Mutation bei der das gesamte Exon 9 deletiert ist (*PS1dE9*). Bei heterozygoten Tieren treten im Gehirn erste A β -Plaques im Alter von 6 Monaten auf. In der Retina wurden diese Ablagerungen ab einem Alter von 2 Monaten (Koronyo-Hamaoui et al, 2011) bzw. 12 Monaten (Perez et al, 2009) beschrieben. Beide Transgene liegen auf demselben Genlocus und werden somit zusammen vererbt. Deshalb war eine Genotypisierung auf die Gensequenz des humanen *PS1* vollkommen ausreichend (Tabelle 5). Um zu gewährleisten, dass jeder PCR-Ansatz genomische DNA enthielt, wurden Primer gegen das Mausgen *IL-2* (*Interleukin-2*) mitgeführt.

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Produkt	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min:sek]	Zyklen
Hot Master Mix	10	94	3:00	1 x
PrimerIMR 42 (20 μ M)	0,6	94	0:30	} 35 x
PrimerIMR 43 (20 μ M)	0,6	54	1:00	
PrimerIMR 1644 (20 μ M)	0,8	72	1:00	
PrimerIMR 1645 (20 μ M)	0,8	72	2:00	1 x
Template DNA	2	4	∞	1 x
H ₂ O	10,2			
Zielgen / Länge Amplifikat [bp]		Primer / Sequence 5' \rightarrow 3' / Tm [$^{\circ}$ C]		
<i>PS1</i> / 608		IMR1644 / AAT AGA GAA CGG CAG GA / 50,4 IMR1645 / GCC ATG AGG GCA CTA AT / 52,8		
<i>IL-2</i> / 324		IMR42 / CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT / 59,3 IMR43 / GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C / 61,3		

Tabelle 5: Genotypisierung DeltaE9

4.2.2 Tg2576

Die Linie B6;SJL-Tg(*APP*^{swe})2576Kha (Hsiao et al, 1996), im Folgenden als Tg2576 bezeichnet, wurde von Taconic (Köln) bezogen. Diese Mäuse auf C57BL/6 x SJL-Hintergrund exprimieren humanes *APP* mit der schwedischen Doppelmutation (K670N/M671L) unter der Kontrolle des Prion-Promotors. Erste A β -Plaques zeigen sich in der Hirnrinde im Alter von 12 Monaten in heterozygoten Tieren. Beschrieben sind auch A β -Plaques in der Retina bei dieser Linie ab einem Alter von 14 Monaten (Liu et al, 2009). Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch eine PCR auf das humane *APP* (Tabelle 6). Um zu gewährleisten, dass jeder PCR-Ansatz genomische DNA enthielt, wurden die von Jackson Laboratories empfohlene Primer gegen das Mausgen *TCRA* (*T-Zell-Rezeptor alpha*) mitgeführt.

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Produkt	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min:sek]	Zyklen
Hot Master Mix	10	94	3:00	1 x
PrimerIMR 3610 (20 μ M)	1	94	0:30	} 35 x
PrimerIMR 3611 (20 μ M)	1	52	1:00	
PrimerIMR 8744 (20 μ M)	0,7	72	1:00	
PrimerIMR 8745 (20 μ M)	0,7	72	2:00	1 x
Template DNA	2	4	∞	1 x
H ₂ O	9,6			
Zielgen / Länge Amplifikat [bp]	Primer / Sequence 5' \rightarrow 3' / Tm [$^{\circ}$ C]			
<i>APP</i> / 377	IMR3610 / AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG / 61,4 IMR3611 / CGG GGG TCT AGT TCT GCA T / 58,8			
<i>TCRA</i> / 200	IMR8744 / GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT / 55,3 IMR8745 / CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG / 57,3			

Tabelle 6: Genotypisierung Tg2576

4.2.3 APPPS1

Die Linie APPPS1 (Radde et al, 2006) wurde von Prof. M. Jucker (Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen) zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund exprimieren humanes *APP* mit der schwedischen Doppelmutation (K670N/M671L) sowie eine *PS1*-Mutation (L166P) unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Pomotors.

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Produkt	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min:sek]	Zyklen
Hot Master Mix	10	94	3:00	1 x
PrimerIMR 42 (20 μ M)	0,6	94	0:30	} 35 x
PrimerIMR 43 (20 μ M)	0,6	54	1:00	
PrimerIMR 1644 (20 μ M)	0,8	72	1:00	
PrimerIMR 1645 (20 μ M)	0,8	72	2:00	1 x
Template DNA	2	4	∞	1 x
H ₂ O	10,2			
Zielgen / Länge Amplifikat [bp]	Primer / Sequence 5' \rightarrow 3' / Tm [$^{\circ}$ C]			
<i>PS1</i> / 608	IMR1644 / AAT AGA GAA CGG CAG GA / 50,4 IMR1645 / GCC ATG AGG GCA CTA AT / 52,8			
<i>IL-2</i> / 324	IMR42 / CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT / 59,3 IMR43 / GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C / 61,3			

Tabelle 7: Genotypisierung APPPS1

Bei heterozygoten Tieren finden sich im Gehirn bereits im Alter von 2 Monaten erste A β -Plaques. Zur retinalen Pathologie war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nichts bekannt. Beide Transgene liegen auf demselben Genlocus und werden gemeinsam vererbt. Deshalb reicht der Nachweis des humanen *PS1* zur eindeutigen Genotypisierung der Mäuse (Tabelle 7) aus. Um zu gewährleisten, dass jeder PCR-Ansatz genomische DNA enthielt, wurden Primer gegen das Mausgen *IL-2* mitgeführt.

4.2.4 3xTg-AD

Die Linie 3xTg-AD (Oddo et al, 2003) wurde von Prof. F. LaFerla (University of California, Irvine, USA) bezogen. Diese Mäuse auf C57BL/6 x 129S-Hintergrund exprimieren humanes *APP* mit der schwedischen Doppelmutation (K670N/M671L), eine *PS1*-Mutation (M146V) sowie eine *MAPT*-Mutation (P301L) unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1-Promotors. Im Gehirn zeigen homozygote 3xTg-AD im Alter von 8 Monaten ausgeprägte extrazelluläre A β -Plaques und ab 12 Monaten intrazelluläre Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau. Zur retinalen Pathologie dieser Linie war vor Beginn der vorliegenden Arbeit nichts bekannt. Die Tiere wurden untereinander verpaart, wodurch alle drei Mutationen homozygot vorlagen und keine PCR zur Genotypisierung notwendig war.

4.2.5 P301S

Die Linie P301S (Allen et al, 2002) wurde von Prof. M. Goedert (University of Cambridge, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse wurden auf C57BL/6-Hintergrund zurück gekreuzt und exprimieren unter der Kontrolle des Thy1-Promotors eine humane *MAPT*-Mutation (P301S). Im Gehirn und Rückenmark zeigen homozygote Mäuse bereits im Alter von 5-6 Monaten ausgeprägte Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau, während heterozygote Tiere erst ab 12 Monaten einen gleichartigen Phänotyp aufweisen. Zu diesen Zeitpunkten entwickeln homozygote und heterozygote P301S-Tiere funktionelle Beeinträchtigungen (Muskelschwäche, Tremor und Paraparese). In der Retina wurden Ablagerungen von hyperphosphorylierten und fibrillären Tau-Aggregaten ab einem Alter von 6 Wochen in RGC gefunden (Gasparini et al, 2011).

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Produkt	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min:sek]	Zyklen
Hot Master Mix	10	95	5:00	1 x
Primer P301S_1 (10 μ M)	1	95	0:20	} 37 x
Primer P301S_2 (10 μ M)	1	56	0:20	
Primer IMR8744 (20 μ M)	0,7	72	0:20	
Primer IMR8745 (20 μ M)	0,7	72	2:00	1 x
Template DNA	2	4	∞	1 x
H ₂ O	9,6			
Zielgen / Länge Amplifikat [bp]	Primer / Sequence 5' \rightarrow 3' / Tm [$^{\circ}$ C]			
<i>MAPT</i> / 350	P301S_1 / GGT TTT TGC TGG AAT CCT GG / 57,3 P301S_2 / GGA GTT CGA AGT GAT GGA AG / 57,3			
<i>TCRA</i> / 200	IMR8744 / GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT / 55,3 IMR8745 / CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG / 57,3			

Tabelle 8: Genotypisierung P301S

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch eine PCR auf das humane *MAPT*-Transgen (Tabelle 8). Um zu gewährleisten, dass jeder PCR-Ansatz genomische DNA enthielt, wurden die von Jackson Laboratories empfohlene Primer gegen das Mausgen *TCRA* mitgeführt. Zudem wurden Versuche an P301S-Tieren durchgeführt, deren Zygotie geklärt werden musste. Diese wurde mittels qPCR an dem Light Cycler 480 unter Verwendung des Power SYBR Green Mastermix ermittelt. Bei dieser Methode macht man sich zu Nutze, dass der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green in doppelsträngige DNA interkaliert und somit die gemessene Fluoreszenzintensität die Menge an PCR-Produkt widerspiegelt. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wird in der exponentiellen Anstiegsphase des PCR-Produkts der CT-Wert ermittelt. Dieser wird hauptsächlich durch die Menge des Ausgangsprodukts beeinflusst und ist somit ein Maß zur Unterscheidung homozygoter oder heterozygoter Tiere. Im Detail wurde vor der qPCR der DNA-Gehalt jeder Probe mittels Nano-Drop gemessen und je Ansatz 5 μ l (10 ng/ μ l) Template DNA eingesetzt (Tabelle 9). Um eine relative Quantifizierung des Ausgangsprodukts zu ermöglichen, ist es notwendig, die erhaltenen CT-Werte der P301S-qPCR auf den CT-Wert eines im Tier konstant vorkommenden Gens zu normalisieren. Deshalb wurden für jede Maus die qPCR auch gegen das *ACTB*-Gen durchgeführt. So können etwaige Variationen in den Ausgangskonzentrationen ausgeglichen werden. Alle Proben wurden in Triplets aufgetragen und die erhaltenen CT-Werte gemittelt. Neben Negativkontrollen wurden auch Triplets von P301S-Tieren mitgeführt, bei denen die Zygotie bereits gesichert war. Zusätzlich wurde die Spezifität der Amplifikate durch Schmelzkurven zwischen 60-90 $^{\circ}$ C bestimmt.

qPCR-Ansatz P301S Tau		qPCR-Programm		
Produkt	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min:sek]	Zyklen
Power Sybr Green	25	50	2:00	1 x
Primer P301_RT1 (20 µM)	2,5	95	10:00	1 x
Primer P301_RT2 (20 µM)	2,5	95	0:15	} 40 x
Template DNA (10 ng/µl)	5	60	1:00	
H ₂ O	15	40	0:30	1 x
qPCR Ansatz ACTB		60 – 90	Je 0:01	1 x
		4	∞	1 x
Power Sybr Green	25			
Primer β-Aktin for (5 µM)	3			
Primer β-Aktin rev (5 µM)	9			
Template DNA (10 ng/µl)	5			
H ₂ O	8			
Zielgen / Länge Amplifikat [bp]	Primer / Sequence 5' → 3' / Tm [°C]			
<i>Tau</i> / 94	P301_RT1 / AAG AAG CAG GCA TTG GAG ACA / 57,9 P301_RT2 / GAC CAG CAG CTT CGT CTT CC / 61,4			
<i>ACTB</i> / 77	β-Aktin for / CCA CTG CCG CAT CCT CTT CC / 63,5 β-Aktin rev / CTC GTT GCC AAT AGT GAT GAC CTG / 62,7			

Tabelle 9: Bestimmung der Zygotie der P301S-Tiere mittels qPCR

4.2.6 YFPH

Die Linie B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J (Feng et al, 2000), im Weiteren als YFPH-Linie bezeichnet, wurde von Jackson Laboratories (Maine; USA) bezogen. Diese Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund exprimieren unter der Kontrolle des Thy-1-Promotors ein Transgen für *YFP* (yellow fluorescent protein) aus der Alge *Aequorea victoria* (Ormo et al, 1996). Hierdurch kommt es in einzelnen RGC zu einer Expression des Fluorophors YFP, welches mit Laserlicht in vivo angeregt und die Zellen somit dargestellt werden können (Leung et al, 2011; Walsh & Quigley, 2008). Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch eine PCR auf das *YFP*-Transgen (Tabelle 10). Um zu gewährleisten, dass jeder PCR-Ansatz genomische DNA enthielt, wurden die von Jackson Laboratories empfohlene Primer gegen das Mausgen *TCRA* mitgeführt. Im Weiteren wurden Mäuse der Linie YFPH mit P301S-Tieren verkreuzt. Durch eine Rückkreuzung der F1-Generation wurden Mäuse mit dem Genotypen P301S (+/+) x YFPH gezüchtet, deren Zygotie durch die qPCR (Tabelle 9) ermittelt wurde.

PCR-Ansatz		PCR-Programm		
Produkt	Volumen [μ l]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min:sek]	Zyklen
Hot Master Mix	10	94	5:00	1 x
Primer IMR7303 (10 μ M)	1	94	0:20	} 37 x
Primer IMR9296 (10 μ M)	1	61	0:20	
Primer IMR8744 (10 μ M)	0,7	72	0:20	
Primer IMR8745 (10 μ M)	0,7	72	2:00	1 x
Template DNA	2	4	∞	1 x
H ₂ O	10,6			
Zielgen / Länge Amplifikat [bp]	Primer / Sequence 5' \rightarrow 3' / Tm [$^{\circ}$ C]			
<i>YFP</i> / 300	IMR7303 / TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA GG (62.4) IMR9296 - CGC TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG (64.2)			
<i>TCRA</i> / 200	IMR8744 - GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT (57,3) IMR8745 - CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG (55,3)			

Tabelle 10: Genotypisierung YFPH

4.2.7 C57BL/6

Die Linie C57BL/6 wurde von Jackson Laboratories (Maine; USA) bezogen. Diese Tiere wurden in der vorliegenden Arbeit für Kontrollexperimente herangezogen.

4.3 Transkardiale Perfusion, Gewebe-Präparation und -Fixation

Für histologische Untersuchungen an Retina- und Gehirngewebe der Mäuse wurden diese zunächst transkardial perfundiert. Vor der Perfusion erhielten die Tiere eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Ketamin/Xylazin (Ketamin: 0,14 mg/g Körpergewicht, Xylazin: 0,01 mg/g Körpergewicht). Der Narkosestatus wurde durch Reflexkontrollen überprüft, bevor das Tier fixiert und sowohl Bauchraum als auch Brustkorb geöffnet wurden. Danach wurde in den linken Herzventrikel eine Perfusionskanüle eingeführt und die Vena cava durchtrennt. Mit Hilfe eines Pumpsystems wurde zunächst 3 min PBS durch das Gefäßsystem gespült, bis die austretende Flüssigkeit frei von Blutresten war. Zur Fixation wurde anschließend für weitere 5 min mit 4 % PFA gespült (jeweils 2 ml/min). Nach der Perfusion wurden die Augen und das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel präpariert und in 4 % PFA bei 4 $^{\circ}$ C über Nacht nachfixiert. Wholmount-Präparate der Retinae wurden direkt nach der Perfusion angefertigt. Dabei wurden alle folgenden Präparationsschritte in PBS unter dem Stereomikroskop durchgeführt. Zunächst wurde mit einem spitzen Skalpell die Cornea angestochen und diese

durch Schneiden entlang der Ora serrata entfernt. Nun konnte die Linse samt Glaskörper vorsichtig entfernt werden. Anschließend wurde die Retina im Augenbecher für 45 min in 4 % PFA bei RT fixiert und danach vorsichtig vom Augenbecher getrennt. Dabei wurden drei Schnitte in die Retinae gesetzt, um sie später auf die Objektträger eben ausbreiten zu können.

4.4 Humanes Gewebe

Im Rahmen der autoptischen Aufgaben des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung wurden Gehirn und Retina von mehreren verstorbenen Patienten entnommen, die an AD (n = 6) oder PSP (n = 2) erkrankt waren bzw. keine klinischen Auffälligkeiten von Demenz gezeigt hatten (n = 4) (Tabelle 11).

Fall	Krankheit	Stadium (Braak, CERAD)	Alter / Geschlecht	PI
1	AD	VI, C	39 / m	7 h
2	AD	VI, C	73 / w	20 h
3	AD	VI, C	85 / m	27 h
4	AD	VI, C	56 / w	22 h
5	AD	VI, C	37 / m	24 h
6	AD	V, C	79 / m	72 h
7	PSP	-	67 / m	40 h
8	PSP	-	84 / w	8 h
9	Kontrolle	0	53 / m	24 h
10	Kontrolle	0	56 / m	72 h
11	Kontrolle	I	60 / w	18 h
12	Kontrolle	I	57 / m	16 h

Tabelle 11: Untersuchte humane Fälle

AD, Morbus Alzheimer; w, weiblich; m, männlich; PI, Postmortalintervall; PSP, progressive supranukleäre Blickparese. Das Stadium der Alzheimer-Demenz wurde durch histologische Untersuchungen nach den Braak- und CERAD-Kriterien bestimmt (nähere Ausführungen siehe Text).

Das Stadium der Alzheimer-Demenz wurde durch histologische Untersuchungen entsprechend der aktuell gültigen Kriterien (siehe unten) durch jeweils zwei Neuropathologen bestimmt. Die Stadieneinteilung erfolgte dabei zum einen auf Grund der Ausbreitung neurofibrillärer Veränderungen im Bereich des medialen Temporallappens und des okzipitalen Cortex nach Braak (Stadien I-VI) (Braak et al, 2006). Zum anderen wurde eine semi-quantitative Schätzung der Anzahl neuritischer Plaques im Frontal-, Parietal- und Temporallappen gemäß den CERAD-Kriterien durchgeführt (Stadien A-C) (Mirra et al, 1991).

Nach den Richtlinien des National Institute of Aging für die post mortem Diagnose, gilt eine Alzheimer-Demenz bei den Braak Stadien V oder VI sowie CERAD C als höchstwahrscheinlich (NIA, 1997). Die benötigten Gehirnareale wurden direkt nach der Autopsie präpariert und für mindestens eine Woche in 4 % Formalin fixiert. Nach der Entnahme der humanen Augen wurden diese für 2-3 Tage in 4 % Formalin fixiert. Die histologischen Färbungen wurden von den Mitarbeitern der Routinediagnostik des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung durchgeführt. Sowohl neurofibrilläre Veränderungen als auch neuritische Plaques wurden durch Färbungen mit Antikörpern gegen hyperphosphoryliertes Tau (Klon AT8) dargestellt (vgl. hierzu Kapitel 4.5.2).

4.5 Immunhistochemische Methoden

4.5.1 Immunhistochemische Färbungen von Retina-Wholemounds und Gehirnschnitten

Im Folgenden werden die immunhistochemischen Färbungen an Retina-Wholemounds und Gehirnschnitten der transgenen Mäuse beschrieben. Das Gehirn und die Retina wurden wie im Kapitel 4.3 erläutert präpariert und fixiert. Daraufhin wurden von dem Gehirn mit Hilfe eines Vibratoms 100 µm dicke Frontalschnitte in Höhe des somatosensorischen Cortex angefertigt. Sowohl die Retina-Wholemounds als auch die Gehirnschnitte wurden zunächst über Nacht bei RT mit 2 % Triton-X in PBS permeabilisiert. Unspezifische Epitope wurden danach für 1 h mit Casein I-Block abgeblockt. Für die spezifische Erkennung relevanter Epitope wurden folgende Antikörper über Nacht bei RT zugegeben: AT8 und AT100 gegen hyperphosphoryliertes Tau, 6E10 gegen A β , oder NeuN als neuronenspezifischer Marker (Tabelle 12). Daraufhin wurde das Gewebe 3 x 10 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem Anti-Maus-Sekundärantikörper (Alexa Fluor 647) für weitere 4 h behandelt und nochmals 3 x 10 min in PBS gewaschen. Für eine Co-Färbung mit Fluorophoren gegen fibrilläre Tau- und A β -Aggregate wurde das Gewebe mit FSB (23,8 µM), Methoxy-X04 (29 µM) oder BSc4090 (5,4 µM) behandelt und erneut 3 x 10 min in PBS gewaschen. Alternativ wurde das Gewebe mit Thioflavin-S (1%) für 10 min gefärbt und in 100 % EtOH, 70 % EtOH, 50 % EtOH (jeweils kurz) und PBS (3 x 10 min) gewaschen. Danach wurden die histologischen Schnitte und die Retina-Wholemounds vorsichtig mit Pinseln auf Objektträgern ausgebreitet und mit Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt.

Primär-Antikörper	Antigen	Hersteller/ Nummer	Konz.
4G8	β -Amyloid AS 17-24, APP	Calbiochem / NE1002	1:1000
6E10	β -Amyloid AS 1-17, APP	Sigma / A-1474	1:100
AT8	phospho-Tau Ser396/404	Thermo Scientific / MN1020	1:200
AT8 Biotin-markiert	phospho-Tau Ser396/404	Thermo Scientific / MN1020B	1:200
AT100	phospho-Tau Ser212/Thr214	Thermo Scientific / MN1060	1:200
AT180	phospho-Tau Thr231/Ser235	Thermo Scientific / MN1040	1:50
AT270	phospho-Tau Thr181	Thermo Scientific / MN1050	1:200
NAB228	β -Amyloid, APP	Santa Cruz / sc-32277	1:50
NeuN	neuronale Nuclei	Millipore / MAB377	1:300
PHF-1	phospho-Tau Ser396/404	Peter Davis (Otvos et al, 1994)	1:1000
Sekundär-Antikörper			
anti-ms Alexa647	Maus IgG	Life Technologies / A-21236	1:200

Tabelle 12: Verwendete Antikörper

4.5.2 Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten

Sowohl humanes als auch murines Material wurde nach der Fixation automatisch durch den Hypercenter Excelsior eingebettet (Programm: 3 h 50 % EtOH, 3 h 60 % EtOH, 2 d 70 % EtOH, 2-3 d 96 % EtOH) und in einer Ausgießstation EC350 in Paraffin gegossen. Aus den abgekühlten Blöcken wurden schließlich am Mikrotom 2-4 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert (2 x 15 min Xylol, 5 min 100 % EtOH, 5 min 90 % EtOH, 5 min 70 % EtOH) und abhängig von dem verwendeten Antikörper eine Antigendemaskierung in Citratpuffer für 30 min (Antikörper AT8) bzw. für 2 min kochend in Ameisensäure (Antikörper 4G8) durchgeführt. Die Färbung der Schnitte erfolgte standardisiert in dem Benchmark Färbeautomaten unter Verwendung des I-View DAB Detection Kit (Ventana). Dabei wurden die zu untersuchenden Epitope mit spezifischen Antikörpern markiert: gegen hyperphosphoryliertes Tau (AT8, AT180, AT270 oder PHF-1) und gegen A β (4G8 oder NAB228), (Tabelle 12). Nach der Anleitung des I-View DAB Detection Kits wurde im Folgenden durch ein indirektes Biotin-Streptavidin-System das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) umgesetzt. Dieses erscheint nach der Färbung braun und kann mit konventioneller Lichtmikroskopie untersucht werden. Zusätzlich wurden die histologischen Präparate im Färbeautomaten mit Hämatoxylin behandelt, wodurch die Zellkerne blau erscheinen. Zur Darstellung neuritischer Plaques und von NFT wurden die Präparate nach der Gallyas-Methode versilbert.

Für immunfluoreszente Färbungen wurden die Schnitte deparaffiniert und eine Vorbehandlung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Danach wurden unspezifische Epitope

für 30 min mit Casein I-Block abgeblockt und zusätzlich endogenes Biotin mit dem Biotin-Blocking Kit nach Produktangaben geblockt. Die Schnitte wurden mit Biotin-markierten AT8 über Nacht behandelt. Nach 3 x 10 min Waschen in PBS wurde die Färbung mit Hilfe des TSA KITs nach Produktangaben vervollständigt. Im Wesentlichen wird dabei durch eine an Streptavidin gekoppelte HRP (Meerrettichperoxidase) der Farbstoff Tyramid Alexa 647 umgesetzt. Nach weiteren 3 x 10 min Waschen in PBS wurden die Schnitte weiterhin mit 23,8 µM FSB für 30 min gegengefärbt und anschließend 3 x 10 min in PBS gewaschen. Alternativ wurden die Schnitte mit Thioflavin-S, wie unter Kapitel 4.5.1 beschrieben, gegengefärbt. Danach wurden die Färbungen mit Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt.

4.6 Mikroskopie

Die histologischen Färbungen mit fluoreszenten Farbstoffen oder Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM510 analysiert. Detailaufnahmen erfolgten mit dem Ölimmersions-Objektiv bei 40 x Vergrößerung (Plan-Apochromat, NA 1,3) bei verengten Pinhole. Übersichtsaufnahmen von Retina-Wholemounts (Tile Scans aus 13 x 13 Einzelbildern) wurden mit einem 20 x Luftobjektiv (Plan-Neofluar, NA 0,4) bei komplett geöffnetem Pinhole durchgeführt, um alle Zellen der GCL zu detektieren. Die xyz-Abstände betragen hierbei 0,11 µm x 0,11 µm x 1 µm bei 40 x Vergrößerung bzw. 0,88 µm x 0,88 µm x 1 µm bei 20 x Vergrößerung. In Doppel- und Tripelfärbungen wurden die Fluorophore an Hand der verschiedenen spektralen Eigenschaften voneinander getrennt: FSB (Anregung 458 nm / Emissions-Langpassfilter LP 475), YFP (Anregung 514 nm / Emissions-Bandpassfilter BP 500-550 nm), Alexa647 (Anregung 633 nm / Emission LP 650 nm). Die DAB-Färbungen der Paraffinschnitte wurden am Lichtmikroskop BX50 untersucht und Detailaufnahmen bei 40 x Vergrößerung (UPlanFI, 0,75 NA) über eine Kamera (ColorView) erstellt.

4.7 In vivo Untersuchung der Mausretina

Zur ophthalmologischen Untersuchung der Mausretina wurde ein modifiziertes Spectralis HRA+OCT von Heidelberg Engineering verwendet (im Folgenden als Multiline OCT bezeichnet). Im Gegensatz zum kommerziell erhältlichen Spectralis HRA+OCT enthielt das verwendete Gerät vier verschiedene Laserquellen: 450 nm und 488 nm zur Anregung von

Fluorophoren, 820 nm für den Reflektionsmodus und 880 nm für den OCT-Modus. Die Laserleistung bei 488 nm und 450 nm wurde im Vergleich zu dem kommerziellen Gerät auf 580 μ W erhöht und der Durchmesser des anregenden Laserstrahls auf 2 mm verringert, um eine effizientere Einkopplung des Lichts in die kleine Mauspupille zu gewährleisten. Der Einbau eines speziellen Filterrads mit vier Emissionsfiltern (LP 458, BP 498-525, BP 525-576 und BP 577-669) ermöglichte die Unterscheidung verschiedener Fluorophore. Entsprechend früherer Publikationen wurde zur Reduktion der sphärischen Aberration zusätzlich eine doppelt asphärische Spaltlampenlupe (78D) vor der Kameralinse befestigt (Fischer et al, 2009; Huber et al, 2009; Seeliger et al, 2005). Generell ermöglichte der Multiline OCT in diesem Aufbau zwei verschiedene Untersuchungs-Modi: Zum einen konnte im cSLO-Modus ein Abbild des Mausfundus erzeugt werden (15°, 20° und 30° Bildfeld). Das cSLO war dabei besonders geeignet, um mit den Lasern bei 450 nm und 488 nm Fluorophore anzuregen und zu detektieren. Zum anderen ermöglichte der OCT-Modus bei 880 nm die in vivo Darstellung der einzelnen Retinaschichten (Abbildung 8).

Die in vivo Untersuchung der Retina (Abbildung 7 a-c) erfolgte an narkotisierten Mäusen. Hierzu erhielten die Tiere eine i.p. Injektion des Ketamin/Xylazin Anästhetikums (Ketamin: 0,14 mg/g Körpergewicht, Xylazin: 0,01 mg/g Körpergewicht), die für eine Narkose von ca. 1 h ausreichte. Sobald die Mäuse keine Reflexe mehr zeigten, wurden die Pupillen mit Tropicamid-Augentropfen dilatiert. Eine speziell angefertigte Halterung diente zur Fixierung der Tiere vor der Kamera und zur Unterdrückung von Artefakten durch die Atmung der Mäuse (Abbildung 7 b). Die Schwenkbarkeit der Halterung ermöglichte die exakte Repositionierung der Tiere bei Langzeituntersuchungen. Vor der Untersuchung wurde außerdem eine spezielle Kontaktlinse (Fischer et al, 2009; Seeliger et al, 2005) mit einem Tropfen Methocel (2 %) benetzt und auf das Mausauge gegeben (Abbildung 7 b, c). Hierdurch blieb das Auge während der Untersuchung feucht und die Refraktion durch den Übergang zwischen Luft und Cornea wurde vermindert. Um ein optimales Bild zu erhalten wurden die Kontaktlinse und Kameralinse in unmittelbare Nähe gebracht.

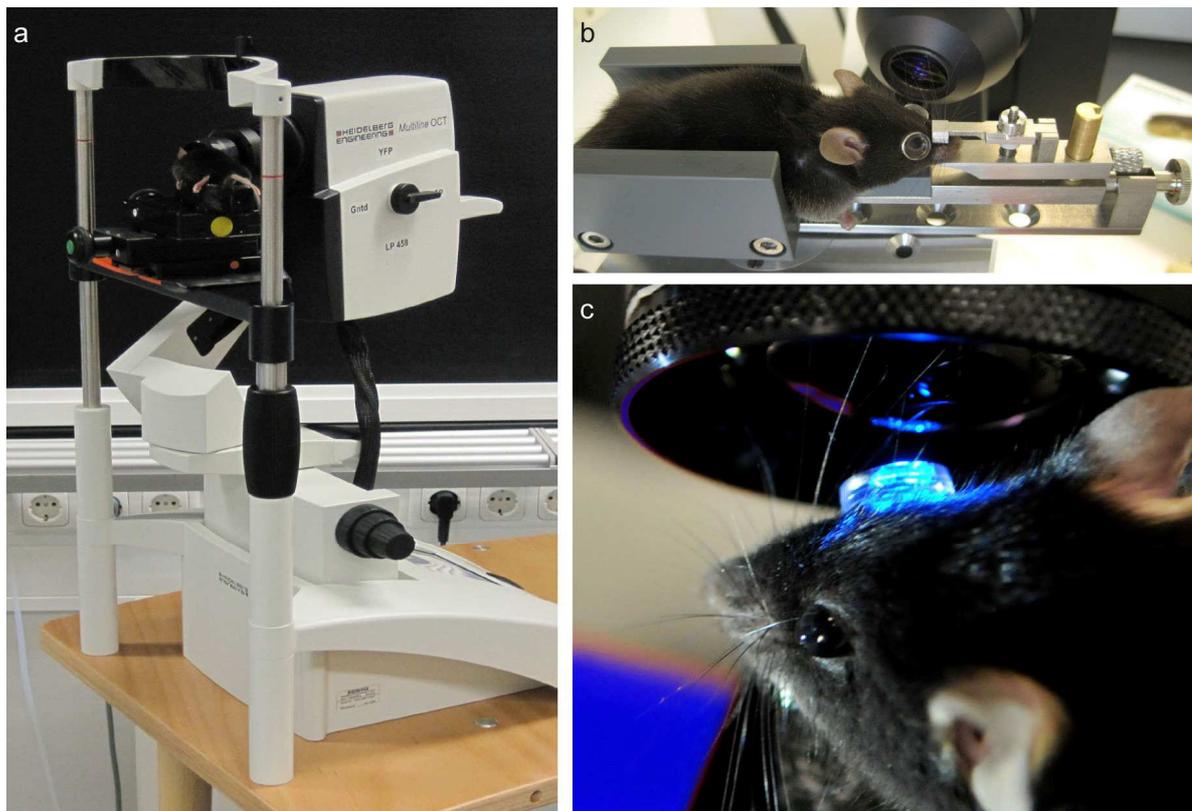


Abbildung 7: In vivo Untersuchung der Mausretina

a Die in vivo Untersuchungen wurden an narkotisierten Mäusen mit dem modifizierten Multiline OCT von Heidelberg Engineering durchgeführt. **b** Eine speziell angefertigte Maushalterung ermöglichte die Fixierung und Positionierung der Mäuse vor der Kamera. **c** Während der Untersuchung wurde das Mausauge durch eine spezielle Kontaktlinse vor Austrocknung geschützt (In diesem Bild nur an einem Auge).

Für den Nachweis fibrillärer A β - oder Tau-Aggregate erhielten die transgenen Tiere 24-48 h vor der in vivo Untersuchung i.p. 300 μ l 2,38 mM FSB (10 μ g/g Körpergewicht) oder 100 μ l 1,35 mM BSc4090 (2 μ g/g Körpergewicht). Die Anregung beider Farbstoffe erfolgte im cSLO-Modus mit 450 nm (Emission LP 458). Das Fluorophor YFP in RGC wurde mit dem 488 nm Laser angeregt (Emission BP 525-576), Punkte erhöhter Autofluoreszenz hingegen mit 450 nm (Emission LP 458) sowie 488 nm (Emission BP 498-525, BP 525-576 und BP 577-669) detektiert. Die OCT-Aufnahmen erfolgten mittels eines auf die Papille zentrierten Kreisscans von 12°. Nach der Untersuchung wurden die Tiere zurück in ihre Käfige überführt und die Augen bis zu ihrem Erwachen mit Augensalbe benetzt. Entzündungen der Augen blieben aus.

4.8 Studie mit GSK3-Inhibitoren

Die Studie mit den GSK3-Inhibitoren erfolgte an homozygoten P301S-Mäusen, die fibrilläre Tau-Aggregate in der Retina entwickeln. Hierfür wurden 40 mg NP12 bzw. 20 mg NP103 in jeweils 160 µl PEG300 gelöst und anschließend mit 1,7 g Erdnussbutter vermischt. Von diesem Gemisch erhielt jedes Tier zwischen dem 2. und 5. Lebensmonat täglich eine Portion von 0,2 g zur p.o. Aufnahme. Damit ergaben sich Endkonzentrationen von 200 µg/g Körpergewicht (NP12) bzw. 100 µg/g Körpergewicht (NP103). Um die Aufnahme der Erdnussbutter zu gewährleisten, mussten die Tiere während des Experiments einzeln gehalten werden.

4.9 Bestimmung der Anregungs- und Emissionsspektren

Die Bestimmung der Anregungs- und Emissionsspektren von FSB und BSc4090 erfolgte an den gelösten Fluorophoren in 100 % EtOH. Hierfür wurden die Lösungen in eine Quartz SUPRASIL Küvette überführt und im LS55 Luminescence Spectrometer vermessen.

4.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaStat (Version 3.5). Statistische Unterschiede zwischen den Daten zu einem Zeitpunkt wurden mit dem Student'schen t-Test (2 Gruppen) oder der einfachen Varianzanalyse (mehr als 2 Gruppen) überprüft. Bei Messungen über mehrere Zeitpunkte wurden die Daten durch Varianzanalyse mit Messwiederholung oder zweifacher Varianzanalyse überprüft. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden ab $p < 0,05$. Alle dargestellten Graphen zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken.

5 Ergebnisse

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis fibrillärer Tau- und A β -Aggregate in den Retinae von transgenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer. Dabei sollten neue Verfahren zur in vivo Darstellung pathologischer A β - bzw. Tau-Aggregate in der Mausretina entwickelt werden. Ein solches Nachweisverfahren konnte für Tau-Aggregate in der Mausretina etabliert und für Langzeituntersuchungen genutzt werden. Zudem wurde die Verwertbarkeit dieser Langzeituntersuchungen zur Verlaufskontrolle von Therapieeffekten auf die Tau-Pathologie überprüft. Bei diesen Untersuchungen lag der Hauptfokus auf den pathologischen Veränderungen in der Retina des P301S-Mausmodells, das Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau entwickelt. Außerdem wurde überprüft, ob eine in vivo Darstellung von A β und Tau in der Retina auch für einen diagnostischen Ansatz am Menschen in Frage kommt.

5.1 Evaluation der in vivo Untersuchung an der Mausretina

5.1.1 cSLO und OCT an der Mausretina

Der klinisch verwendete Retina-Scanner von Heidelberg Engineering ermöglicht die Darstellung von Fluoreszenzsignalen der Retina im cSLO-Modus und von vertikalen Schnittebenen des Gewebes im OCT-Modus (vgl. dazu Kapitel 3.2.2). Im ersten Schritt sollte nun abgeklärt werden, ob der modifizierte Multiline OCT (vgl. dazu Kapitel 4.7) für diese Untersuchungen an der Mausretina ebenso geeignet ist. Dabei stand vor allem im Fokus, inwiefern der cSLO-Modus für die distinkte Darstellung einzelner fluoreszenter Signale auf Zellgröße genutzt werden kann. Wie in Abbildung 8 a dargestellt, zeichnet sich bei einer Anregung von 450 nm (Emission LP 458) in C57BL/6-Mäusen das Blutgefäßsystem bis hin zu feinsten Kapillaren ab. Der Mausfundus konnte ebenso in allen weiteren Kanälen zur Anregung von fluoreszenten Signalen dargestellt werden (Anregung 450 nm, 488 nm; Emission LP 458, BP 498-525, BP 525-576 und BP 577-669). In YFPH-Mäusen konnten bei einer Anregung von 488 nm (Emission BP 525-576) vereinzelte, YFP-positive Zellen in der GCL dargestellt werden (Abbildung 8 b). Abhängig von der Stärke der YFP-Expression, waren neben den Zellsomata auch die Axone und die dendritischen Bäume einzelner Ganglienzellen erkennbar. Neben dem cSLO- wurde auch der OCT-Modus am Mausauge

getestet. Wie sich zeigte, konnte die Mausretina und ihre einzelnen Schichten dabei in vivo dargestellt werden (Abbildung 8 c).

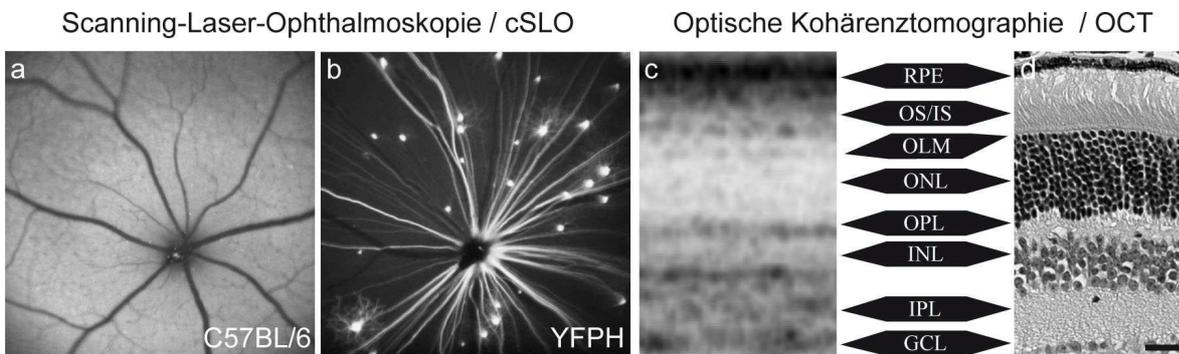


Abbildung 8: Imaging-Modi des Multiline OCT an der Mausretina

a, b In vivo Aufnahmen von fluoreszenten Signalen in der Mausretina im cSLO-Modus (Bildfeld 30°). **a** Darstellung des Blutgefäßsystems und der Papille in der Retina einer C57BL/6-Maus (Anregung 450 nm, Emission LP 458). **b** Darstellung einzelner YFP-positiver RGC der YFPH-Linie (Anregung 488, Emission BP 525-576). **c** In vivo Aufnahmen der einzelnen Schichten der Mausretina im OCT-Modus am Beispiel einer P301S-Maus. **d** Entsprechende Schichten der Retina im histologischen Schnitt. RPE, retinales Pigmentepithel; OS, äußere Segmente der Photorezeptoren; IS, innere Segmente der Photorezeptoren; OLM, äußere limitierende Membran; ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht. Maßstab: 20 µm

5.1.2 Autofluoreszenz in der Mausretina

Bevor die Ergebnisse zu den in vivo Untersuchungen der transgenen Mauslinien vorgestellt werden, muss zunächst auf einen entscheidenden Faktor hingewiesen werden: die Autofluoreszenz in der Mausretina.

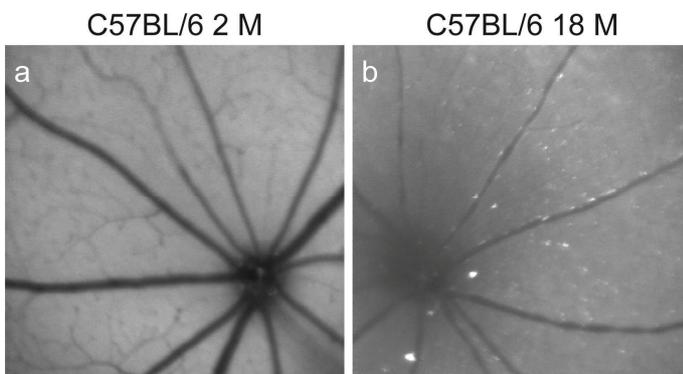


Abbildung 9: Autofluoreszenz in der Mausretina.

cSLO-Aufnahme der Autofluoreszenz in der Retina junger (2 M, **a**) und gealterter (18 M, **b**) C57BL/6-Tiere bei 450 nm Anregung und Emission LP 458 (Bildfeld 20°).

Zwar finden sich in jungen Tieren im Alter von 2 Monaten kaum störende Signale durch Autofluoreszenz in der inneren Retina (Abbildung 9 a), jedoch nimmt diese punktuell mit

fortschreitendem Alter der Tiere stark zu. (Abbildung 9 b). Wie am Beispiel einer 18 Monate alten C57BL/6-Maus gezeigt, entwickeln sich diese Punkte erhöhter Autofluoreszenz auffällig oft entlang der Blutgefäße, folgen ansonsten aber keinem klaren Muster. Die äußere Retina zeigte altersabhängig starke autofluoreszente Ablagerungen, wie auch in der Literatur bereits beschrieben wurde (Xu et al, 2008). Diese autofluoreszenten Punkte wurden mit allen im Multiline OCT zur Detektion von fluoreszenten Signalen verfügbaren Anregungswellenlängen und Emissionsfiltern beobachtet (Anregung 450 nm, 488 nm; Emission LP 458, BP 498-525, BP 525-576 und BP 577-669). Dies war von besonderer Bedeutung für die weitere Vorgehensweise, da eine klare Unterscheidung zwischen den Punkten verstärkter Autofluoreszenz und den Signalen der verwendeten A β - bzw. Tau-spezifischen, fluoreszenten Sonden gewährleistet sein musste.

5.1.3 Evaluation von A β - und Tau-affinen Fluorophoren

Zur in vivo Markierung der A β - und Tau-Aggregate wurden geeignete Fluorophore benötigt.

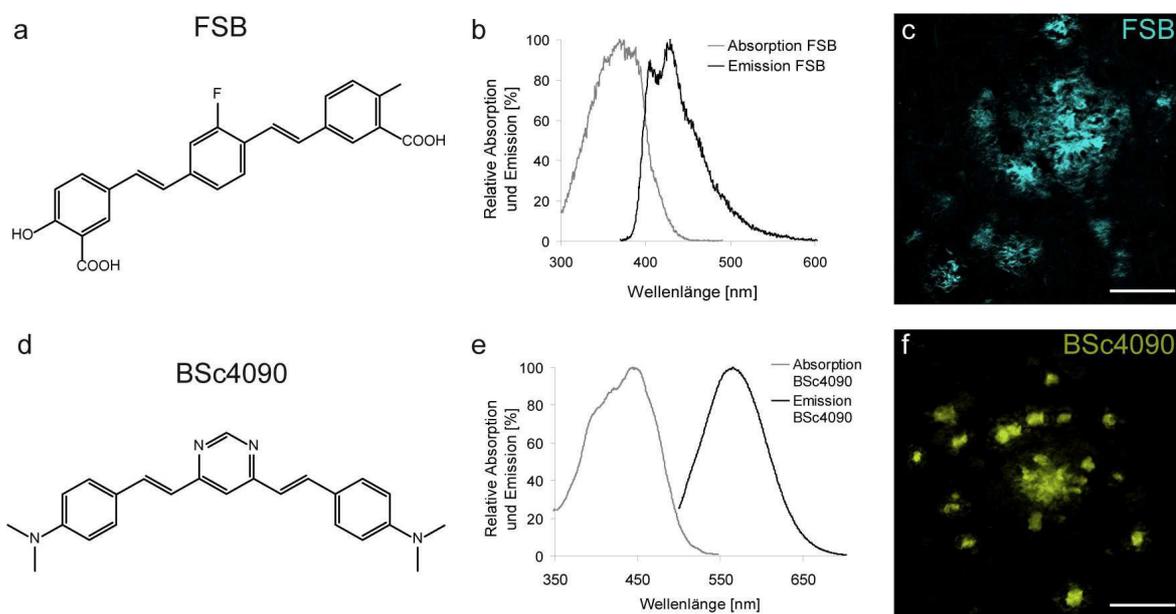


Abbildung 10: A β - und Tau-bindende Fluorophore.

a, d Chemische Strukturen der A β - und Tau-affinen Fluorophore FSB und BSc4090. **b, e** Anregungs- und Emissionsspektren der Fluorophore FSB und BSc4090 gemessen in EtOH. **c, f** Die Fluorophore FSB bzw. BSc4090 färbten deutlich die für diese Mäuse charakteristischen A β -Plaques im Cortex. Maßstab: 50 μ m

Zum einen wurde hierfür das Fluorophor FSB favorisiert, da mehrere Studien gezeigt hatten, dass dieser Farbstoff nach einer systemischen Applikation A β -Plaques bzw. fibrilläre Tau-Aggregate im Gehirn transgener Mäuse markiert (Higuchi et al, 2005; Sato et al, 2004; Velasco et al, 2008) (Abbildung 10 a). Zum anderen wurde uns von unserem Verbundpartner (Boris Schmidt, TU Darmstadt) das Fluorophor BSc4090 mit einer hohen Affinität gegen fibrilläre Tau- und A β -Aggregate zur Verfügung gestellt. Die Affinität zu A β -Plaques und die Hirngängigkeit des Fluorophors BSc4090 wurden bereits durch in vivo Experimente gezeigt (Boländer et al, 2012) (Abbildung 10 d).

Für die beiden Fluorophore wurden zunächst die Anregungs- und Emissionsspektren gemessen (Abbildung 10 b, e). Das relative Absorptionsmaximum von BSc4090 lag bei 445 nm mit einem Emissionsmaximum von 565 nm, während das Absorptionsmaximum bei 369 nm und Emissionsmaximum bei 429 nm von FSB deutlich kurzwelliger ausfiel. Um die Fluorophore auf ihre Hirngängigkeit zu überprüfen, erhielten DeltaE9-Mäuse i.p. Injektionen mit FSB oder BSc4090 und wurden 24 h später perfundiert. In daraufhin angefertigten histologischen Präparaten konnten bei 458 nm Anregung deutlich fluoreszenzmarkierte A β -Plaques detektiert werden. Beispiele für FSB- bzw. BSc4090-gefärbte, charakteristische A β -Plaques im Cortex der DeltaE9-Linie sind in Abbildung 10 c, f dargestellt.

5.2 Retinale Pathologie in Mausmodellen des Morbus Alzheimer

5.2.1 Mausmodelle A β -Pathologie

Zunächst wurden die Retinae von den Mausmodellen DeltaE9, Tg2576, APPPS1 und 3xTg-AD histologisch und in vivo auf das Vorkommen von A β -Plaques untersucht. Diese Mausmodelle exprimieren unter neuronalen Promotoren humanes *APP* bzw. *PS1* mit genetischen Mutationen, die bei FAD-Patienten gefunden wurden. Hierdurch kommt es im Gehirn dieser Mäuse zur Ausbildung von A β -Plaques (vgl. dazu Kapitel 4.2). Da laut neueren Publikationen die Linien DeltaE9 und Tg2576 auch in der Retina A β -Plaques aufweisen sollten (Koronyo-Hamaoui et al, 2011; Liu et al, 2009; Perez et al, 2009), galt diesen Linien besonderes Interesse.

5.2.1.1 Histologische Untersuchungen an Mausmodellen mit A β -Pathologie

Die Retinae der Mausmodelle, die im Gehirn A β -Pathologie entwickeln, wurden zunächst mittels histologischer Methoden untersucht. Konkret wurden dabei folgende Kohorten perfundiert, Paraffinschnitte angefertigt und histologisch gefärbt: DeltaE9 (n = 8; 15 - 28 M), Tg2576 (n = 5; 16 - 23 M), APPPS1 (n = 5; 8 - 22 M) und 3xTg-AD (n = 5; 21 - 32 M). Mit den verwendeten spezifischen Antikörpern gegen A β (Klon 4G8 und NAB228) konnte allerdings kein Nachweis von extrazellulären A β -Plaques in retinalen Paraffinschnitten dieser Linien erbracht werden (Abbildung 11). Zwar wurden DAB-markierte Strukturen in verschiedenen Schichten der Retinae gefunden, allerdings waren diese auch in den Retinae von C57BL/6-Mäusen (n = 2, 4 und 13 M) zu detektieren. Mitgeführte Gehirnschnitte der untersuchten transgenen Mäuse wiesen hingegen eindeutig durch die Antikörper markierte A β -Plaques auf.

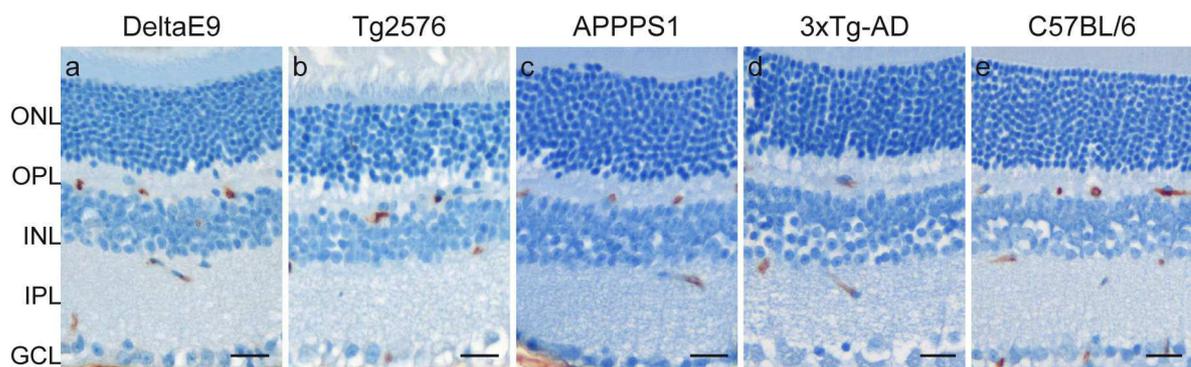


Abbildung 11: Histologische Untersuchungen der Retinae von Mausmodellen, die A β -Pathologie im Gehirn entwickeln.

Exemplarische vertikale Paraffinschnitte der Retinae von den Mäusen **a** DeltaE9 (23 M, m), **b** Tg2576 (16 M, f), **c** APPPS1 (8 M, m), **d** 3xTg-AD (25 M, f) und **e** C57BL/6 (13 M, f). Die Schnitte wurden mit dem Antikörper 4G8 gegen A β (DAB-Färbung, braun) und Hämatoxylin (blau) behandelt. Die immunhistologischen Färbungen mit dem Antikörper 4G8 resultierten in keiner der Linien in einer spezifischen Markierung von A β -Plaques. ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht. Maßstab: 20 μ m

Weiterhin wurden von folgenden Mäusen retinale Wholemouts angefertigt und immunhistochemisch untersucht: DeltaE9 (n = 4; 16 - 28 M), Tg2576 (n = 5; 16 - 27 M), APPPS1 (n = 2; 18 - 22 M) und 3xTg-AD (n = 2; 24 M). Hierfür wurden die Retina-Wholemouts mit dem A β -spezifischen Antikörper 6E10 und mit den Fluorophoren FSB, BSc4090 oder Methoxy-X04 doppelt gefärbt. Auch hier konnten unter dem konfokalen Mikroskop keine Anzeichen für extrazelluläre A β -Plaques in der Retina gefunden werden.

Vereinzelte Tiere der Linie Tg2576 (19 M, m) und APPPS1 (18 M, f) zeigten 6E10-positive, intrazelluläre Anreicherungen, die allerdings nicht positiv für die genannten Fluorophore waren. In mitgeführten Gehirnschnitten der untersuchten Mäuse konnten hingegen eindeutig A β -Plaques detektiert werden, die sowohl für 6E10 als auch für die verwendeten Fluorophore positiv waren.

5.2.1.2 In vivo Untersuchungen an Mausmodellen mit A β -Pathologie

Parallel zu den histologischen Untersuchungen wurden die folgenden Kohorten transgener Tiere in vivo untersucht: DeltaE9 (n = 7; 16 - 24 M), Tg2576 (n = 5; 16 - 22 M), APPPS1 (n = 2; 11 M) und 3xTg-AD (n = 2; 19 - 22 M). Auf Grund der in der Literatur beschriebenen retinalen A β -Plaques der DeltaE9- und Tg2576-Mäuse (Koronyo-Hamaoui et al, 2011; Liu et al, 2009) lag auch hier wieder der Fokus auf diesen Linien. Im Detail wurden die Tiere im cSLO-Modus des Multiline OCT zunächst einer Voruntersuchung unterzogen, um die Punkte erhöhter Autofluoreszenz in den einzelnen Retinae aufzunehmen. Dies wurde für alle zur Detektion von fluoreszenten Signalen verfügbaren Anregungswellenlängen und Emissionsfiltern durchgeführt (Anregung 450 nm, 488 nm; Emission LP 458, BP 498-525, BP 525-576 und BP 577-669). In den Folgetagen erhielten die Mäuse eine i.p. Injektion des Fluorophors BSc4090 und wurden 24 h später nochmals im cSLO-Modus untersucht. Analog zu diesen Experimenten wurden außerdem zwei DeltaE9-Tiere sowie ein Tier der 3xTg-AD-Linie (19 M) mit dem Farbstoff FSB untersucht. Wie in Kapitel 5.1.3 dargestellt, ist diese Zeitspanne zwischen Injektion und Untersuchung vollkommen ausreichend, um in vivo A β -Plaques im Gehirn der DeltaE9-Linie mit diesen Fluorophoren zu markieren. Allerdings konnten nach den Injektionen der Farbstoffe keine neuen fluoreszenten Signale in den Retinae der untersuchten Mäuse im cSLO-Modus detektiert werden. Somit konnte in den untersuchten Linien DeltaE9, Tg2576, APPPS1 und 3xTg-AD auch in vivo kein Nachweis von retinalen A β -Plaques erbracht werden.

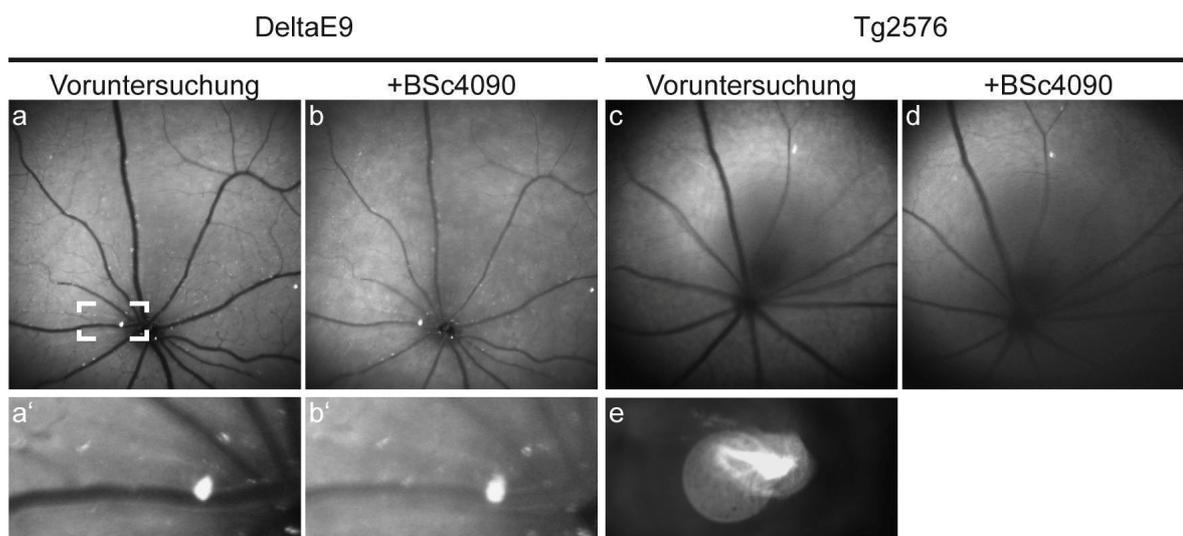


Abbildung 12: In vivo Untersuchungen der Retinae von Mausmodellen, die A β -Pathologie im Gehirn entwickeln.

a-d Repräsentative Untersuchung einer DeltaE9 (17 M, w) bzw. Tg2576 (22 M, m) Mausretina vor (**a, c**) und nach (**b, d**) der Applikation des Fluorophors BSc4090. Die Aufnahmen wurden im cSLO-Modus erstellt (Bildfeld 30°; Anregung 450 nm, Emission LP 458). **a', b'** Vergrößerte Ausschnitte des in **a** markierten Bereichs. **e** Im cSLO-Modus wurden stark fluoreszente Bereiche in der Linse der Tg2576-Mäuse festgestellt, die auf eine Linsentrübung hinweisen. Das abgebildete, kreisrunde Signal ist auf eine Reflektion des Laserlichts zurückzuführen.

In Abbildung 12 sind exemplarisch für diese Negativergebnisse in den untersuchten Linien die Vor- und Nachuntersuchungen der Retinae einer DeltaE9 (17 M, m) und einer Tg2576 (22 M, m) Maus bei der Anregung mit 450 nm (Emissionsfilter LP 458) dargestellt. Laut der spektralen Eigenschaften (Abbildung 10) sollte eine optimale Anregung des Farbstoffes BSc4090 bei 450 nm (LP 458 nm) möglich sein. Die Aufnahmen wurden zur Absicherung zusätzlich in allen zur Verfügung stehenden Anregungswellenlängen und Emissionsfiltern durchgeführt (Anregung 450 nm, 488 nm; Emission LP 458, BP 498-525, BP 525-576 und BP 577-669). Ein weiterer interessanter Befund fand sich während der Untersuchung der Tg2576-Linie. Diese Mäuse entwickelten eine Linsentrübung ähnlich eines Katarakts (Abbildung 12 e), (Melov et al, 2005), die die Erstellung eines scharfen Abbilds des Augenhintergrundes erschwerte und die Linie für eine in vivo Untersuchung generell wenig brauchbar machte.

5.2.2 Untersuchungen an Mausmodellen mit hyperphosphoryliertem Tau

Um der Frage nachzugehen, ob hyperphosphoryliertes Tau in der Retina gebildet wird, wurden die Retinae der Mausmodelle 3xTg-AD und P301S histologisch und in vivo

untersucht. Diese Mausmodelle exprimieren unter neuronalen Promotoren humanes Tau mit genetischen Mutationen, die ursprünglich bei Patienten mit FTDP-17 gefunden wurden. Hierdurch kommt es im Gehirn zu Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau (siehe dazu Kapitel 4.2). Da laut einer neueren Publikation die P301S-Linie auch fibrilläre Tau-Aggregate in der Retina aufweist (Gasparini et al, 2011), stand diese Linie besonders im Fokus.

5.2.2.1 Histologische Untersuchungen an Mausmodellen mit hyperphosphoryliertem Tau

Die histologischen Untersuchungen an Retina-Paraffinschnitten homozygoter P301S-Mäuse (n = 8, 5 - 6 M) ergab einen eindeutigen Nachweis von hyperphosphoryliertem Tau in Zellen der GCL (Abbildung 13 a). Eine vergleichbare Färbung durch den verwendeten Antikörper AT8 konnte in der GCL von C57BL/6 (n = 2, 4 M und 13 M) Mäusen nicht gefunden werden (Abbildung 13 c).

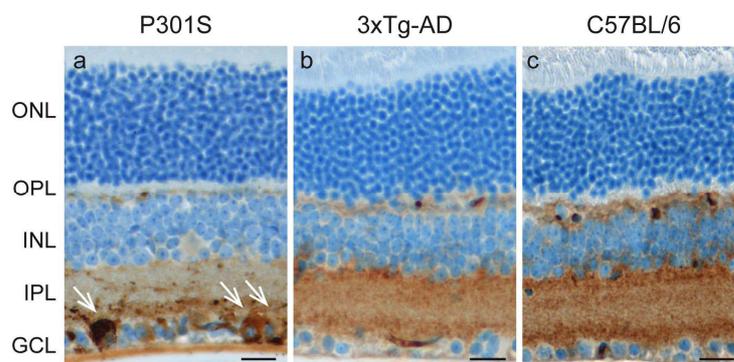


Abbildung 13: Histologische Untersuchungen der Retinae von Mausmodellen, die hyperphosphoryliertes Tau im Gehirn entwickeln.

Exemplarische vertikale Paraffinschnitte der Retinae von Mäusen der Linien **a** P301S (5 M, f), **b** 3xTg-AD (22 M, f) und **c** C57BL/6 (4 M, m). Die Schnitte wurden mit dem Antikörper AT8 gegen hyperphosphoryliertes Tau (DAB-Färbung, braun) und Hämatoxylin (blau) behandelt. **a** AT8-positive RGC in der Retina einer P301S-Maus (Pfeile). **b, c** Keine pathologischen Veränderungen in den Retinae von 3xTg-AD-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen. ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht. Maßstab: 20 µm

In den Retinae der 3xTg-AD-Mäuse (n = 5, 21 - 32 M) konnte mit demselben Antikörper hingegen kein eindeutiger Nachweis des hyperphosphorylierten Tau-Proteins erbracht werden (Abbildung 13 b). Lediglich ein stark gealtertes Tier der 3xTg-AD-Linie (29 M) zeigte eine schwache AT8-Positivität innerhalb der nukleären Schichten. Zwar wurde eine intensive Markierung der plexiformen Schichten in den Linien P301S und 3xTg-AD mit dem

verwendeten Antikörper AT8 beobachtet, allerdings war diese Färbung auch in den Retinae von C57BL/6-Mäusen vorhanden.

Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen an retinalen Wholemounts der P301S-Linie zeigten, dass ein Großteil der Zellen in der GCL schwach positiv für den Antikörper AT8 und AT100 war. Einzelne Zellen der GCL waren sogar stark positiv für diese Antikörper (Abbildung 14 e-e"), welche weiterhin die dendritischen Fortsätze dieser RGC und auch deren Axone markierten (Abbildung 16 b-b"). Die intensiven AT8- und AT100-positiven RGC konnten zusätzlich mit dem Farbstoff FSB angefärbt werden. Alle FSB-positiven RGC waren auch mit dem Antikörper NeuN markierbar, selbst bei P301S-Mäusen mit der weit vorangeschrittenen Pathologie im Alter von 6.5 M (Abbildung 14 f-f"). In den retinalen Wholemounts der 3xTg-AD-Linie (n = 2, 24 M) konnte hingegen keine eindeutige Färbung mit dem Antikörper AT8 nachgewiesen werden, während mitgeführte Gehirnschnitte dieser Tiere stets ein positives Signal für den Antikörper zeigten.

5.2.2.2 In vivo Darstellung von fibrillären Tau-Aggregaten

Die in vivo Untersuchungen der Retinae von P301S-Tieren wurden analog zu den Experimenten an den Mausmodellen, die A β -Pathologie im Gehirn entwickeln, durchgeführt (siehe dazu Kapitel 5.2.1.2). In den Folgetagen nach den Voruntersuchungen im cSLO-Modus erhielten die Tiere eine i.p. Injektion von FSB bzw. BSc4090. 24 h nach der FSB-Applikation konnten klar einzelne, fluoreszierende Punkte in den Retinae homozygoter P301S-Mäuse (5 M) detektiert werden, die in den Voruntersuchungen noch nicht erkennbar waren (Anregung 450 nm, Emission LP 458), (Abbildung 14 a, b). Die cSLO-Untersuchungen von gleichaltrigen C57BL/6-Mäusen zeigten keine vergleichbaren fluoreszenten Signale nach der FSB-Applikation (n = 3), (Abbildung 14 c, d). Im Vergleich konnten 24 h nach der BSc4090-Injektion keine auf fibrilläre Tau-Einschlüsse hindeutenden fluoreszenten Signale mit den verfügbaren Anregungswellenlängen bzw. Emissionsfiltern detektiert werden.

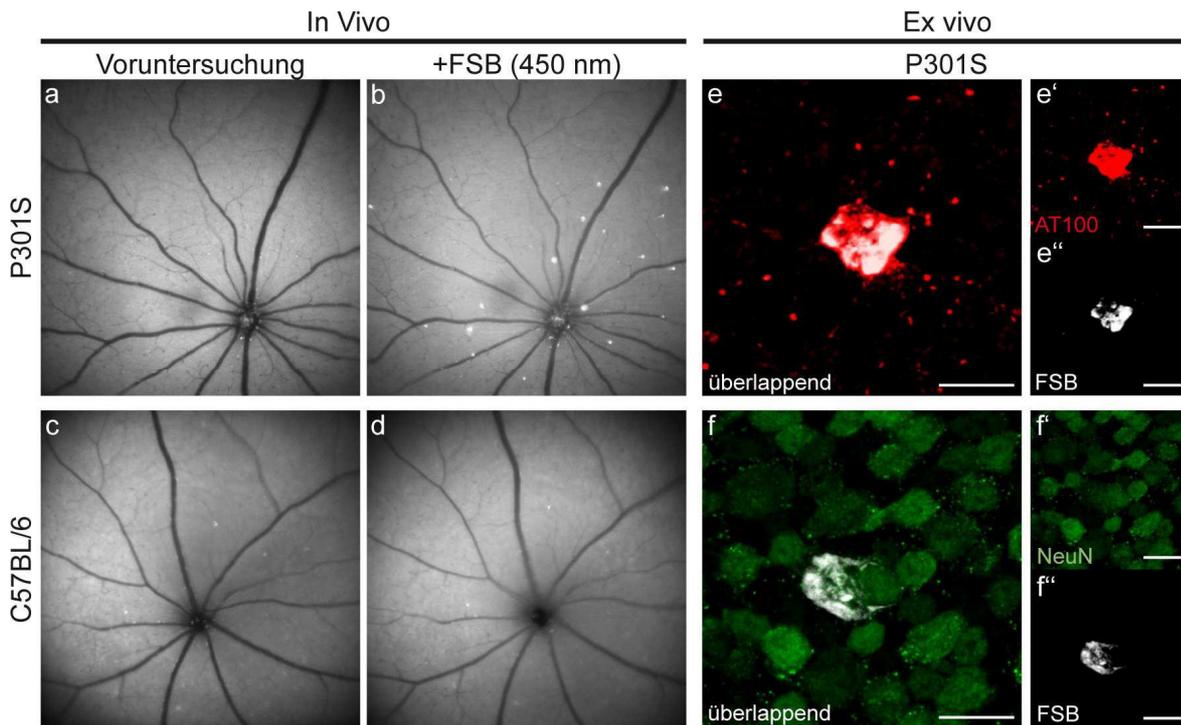


Abbildung 14: Fibrilläre Tau-Aggregate in den Retinae von P301S-Mäusen in vivo und ex vivo.

a, c cSLO-Voruntersuchung einer homozygoten P301S- und C57BL/6-Maus im Alter von 5 Monaten (Anregung 450 nm, Emission LP 458). **b** 24 h nach der systemischen FSB-Injektion konnten fluoreszente Punkte in der Retina der P301S-Maus detektiert werden. **d** Die Retina der C57BL/6-Maus wies hingegen keine FSB-positiven Signale nach der Injektion des Fluorophors auf. **e-e''** Doppelfärbung mit Fluorophor FSB (weiß) und dem Antikörper AT100 gegen hyperphosphoryliertes Tau (rot) im Retina-Wholemount einer P301S-Maus (6,5 M). **f-f''** Doppelfärbung mit dem Fluorophor FSB (weiß) und dem neuronenspezifischen Antikörper NeuN (grün) im Retina-Wholemount einer P301S-Maus (6.5 M). Maßstab: 20 µm

Von großer Bedeutung für die weiteren Experimente war die Diskriminierung der FSB-positiven Signale von den Punkten erhöhter Autofluoreszenz (vgl. dazu Kapitel 5.1.2). Neben der mehrfach angesprochenen Voruntersuchung, stellte sich dabei noch ein weiterer Ansatz als äußerst nützlich heraus: die Unterscheidung des FSB-positiven Signals von den Punkten erhöhter Autofluoreszenz auf Grund der verwendeten Anregungswellenlänge. Das FSB-Signal konnte mit dem Multiline OCT nur mit dem integrierten 450 nm Laser angeregt werden (Emission LP 458), nicht aber mit dem Laser bei 488 nm (Abbildung 15). Wie bereits beschrieben, waren die Punkte erhöhter Autofluoreszenz hingegen sowohl mit 450 nm, als auch mit 488 nm anregbar (vgl. dazu Kapitel 5.1.2).

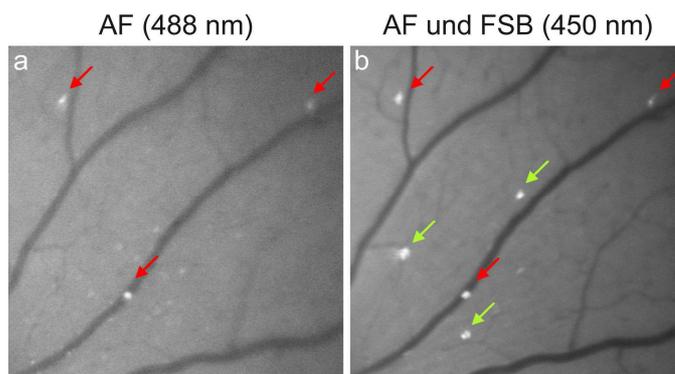


Abbildung 15: Unterscheidung FSB-positiver Zellen von Punkten erhöhter Autofluoreszenz.

Ausschnitt der Retina einer P301S-Maus. Die Aufnahmen erfolgten im cSLO-Modus bei einer Anregung von 488 nm (a) und 450 nm (b) Anregung. Rote Pfeile: Punkte erhöhter Autofluoreszenz; grüne Pfeile: FSB-positive Signale

Um die in vivo detektierten FSB-positiven Signale ex vivo einzelnen Zellen zuzuordnen, die fibrilläres Tau enthalten, wurden Mäuse der P301S-Linie mit Tieren der YFPH-Linie gekreuzt. Diese Mäuse exprimieren das Fluorophor YFP in einzelnen Zellen der GCL, wo auch die AT8- und FSB-positiven Zellen lokalisiert sind (Abbildung 16 b-b'''). Generell wurde eine geringe Anzahl YFP- ($8,3 \pm 1,0$ Zellen pro mm^2 Retina) und FSB-positiver Zellen ($3,5 \pm 0,2$) in 5 - 6.5 Monate alten P301S x YFPH-Mäusen ($n = 4$) beobachtet. Hierdurch exprimierten in diesem Alter nur 2,7 % aller detektierten FSB-positiven Zellen auch das Fluorophor YFP. Bemerkenswerterweise zeigten die dendritischen Fortsätze dieser AT8-, FSB- und YFP-positiven Zellen keinerlei pathologische Auffälligkeiten. In vivo konnten 24 h nach der i.p. Administration von FSB die YFP- und FSB-positiven RGC in derselben fokalen Ebene detektiert werden (Abbildung 16 c, d). Die Diskriminierung der beiden Fluorophore YFP und FSB basierte dabei auf deren spektralen Eigenschaften. Während YFP mit 450 nm (Emission LP 458) und 488 nm (Emission BP 525-576) angeregt werden konnte, wurde FSB nur bei 450 nm (Emission LP 458) detektiert. Durch die Expression von YFP in vereinzelt RGC ergab sich im cSLO für jede Retina ein individuelles Muster an YFP-positiven Signalen. Die in vivo untersuchten Mäuse (Abbildung 16 c, d) wurden anschließend perfundiert und die retinalen Wholemounts ex vivo immunhistochemisch mit dem Antikörper AT8 gegen hyperphosphoryliertes Tau nachgefärbt (Abbildung 16 e, f). Basierend auf dem in vivo detektierten Muster YFP-positiver Zellen, konnten so einzelne FSB-positiv RGC relokalisiert werden, die ausnahmslos positiv für den Antikörper AT8 waren.

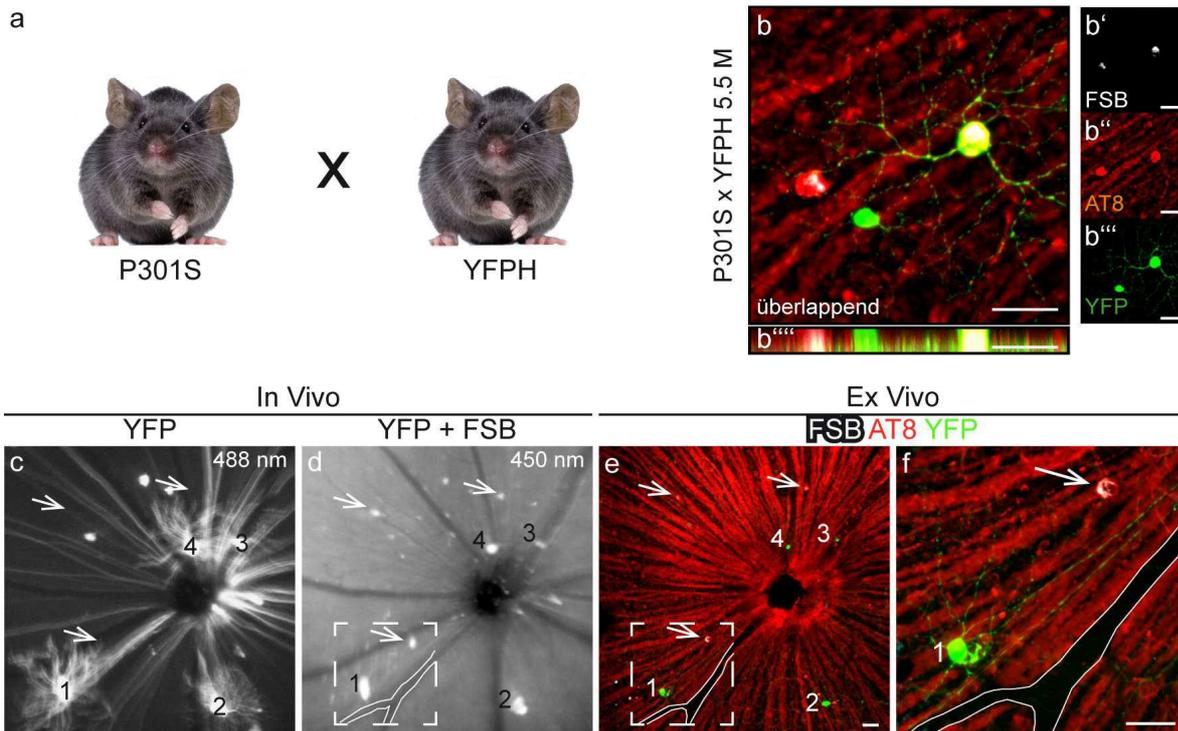


Abbildung 16: FSB-markierte RGC mit hyperphosphoryliertem Tau in den Retinae von P301S-Mäusen.

a Homozygote P301S-Tiere, die mit der YFPH-Linie verkreuzt wurden (5,5 M), zeigten in retinalen Wholemounts RGC positiv für FSB (weiß, **b'**), AT8 (rot, **b''**) und YFP (grün, **b'''**). **b** xy-Projektion, **b''''** xz-Projektion.

c, d In vivo Aufnahmen im cSLO-Modus (20° Bildfeld) einer P301S x YFPH-Maus. **c** Bei 488 nm Anregung wurden YFP-positive RGC detektiert. **d** FSB-positive Zellen (Pfeile) erschienen neben den YFP-positiven bei einer Anregung mit 450 nm. **e, f** Ex vivo Relokalisierung des in vivo detektierten Musters YFP- und FSB-positiver Zellen in **c** und **d**. Die in vivo detektierten FSB-positiven Zellen konnten mit dem Antikörper AT8 gegen hyperphosphoryliertes Tau markiert werden. AT8-positive Axone erscheinen im Hintergrund. **f** Vergrößerung des markierten Bereichs in **d** und **e**. 1-4: hervorstechende YFP-positive Zellen, Maßstab: 50 μ m

5.2.2.3 Kinetik der FSB-Bindung an fibrilläre Tau-Aggregate

Um die Kinetik der FSB-Bindung an die fibrillären Tau-Aggregate in den Retinae der P301S-Tiere im Detail zu betrachten, wurden cSLO-Untersuchungen zu mehreren Zeitpunkten nach einer einmaligen i.p. Injektion von FSB durchgeführt. Bei einer Anregung mit 450 nm (Emission LP 458) war 10 min nach der FSB-Injektion noch kein Fluoreszenzsignal detektierbar (Abbildung 17 a). Nach weiteren 60 min konnte allerdings eine intensive Fluoreszenz in den retinalen Blutgefäßen beobachtet werden, die nach 12 h noch ähnlich intensiv war (Abbildung 17 b, c). Dieses Signal wurde 24 h nach der Injektion im Blutkreislauf

nur noch schwach detektiert und vereinzelte FSB-positive Zellen traten vor der Hintergrundfluoreszenz hervor (Abbildung 17 d). Im weiteren Verlauf konnten diese FSB-positiven Zellen 48 h, 72 h und sogar 1 Monat nach der Injektion des Fluorophors noch beobachtet werden (Abbildung 17 e-g). Ein Verlust an Fluoreszenzintensität der FSB-Signale wurde während des Untersuchungszeitraums von 1 Monat nicht festgestellt. Neue FSB-positive Zellen konnten erst nach einer erneuten Injektion des Fluorophors detektiert werden (Abbildung 17 h).

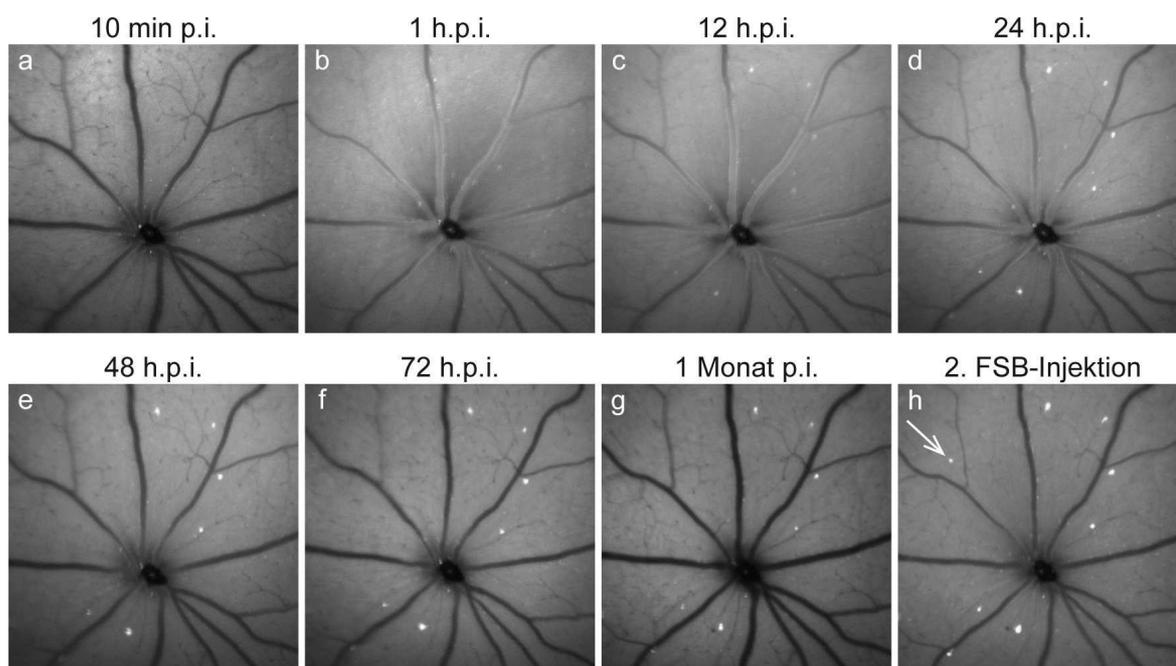


Abbildung 17: Kinetik der FSB-Bindung an Tau-Aggregate in der Retina einer P301S-Maus.

a-g cSLO-Untersuchungen der Retina einer P301S-Maus nach einer einzigen FSB-Injektion (Bildfeld 30°) bei 450 nm Anregung (Emission LP 458). **a** 10 min nach der i.p. Injektion von FSB wurde kein fluoreszentes Signal in der Retina der P301S-Maus (4 M) detektiert. **b, c** Nach weiteren 60 min bzw. 12 h konnte das Fluorophor eindeutig in den Blutgefäßen nachgewiesen werden. **d** Klare, von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidbare, FSB-positive Zellen konnten erst nach 24 h beobachtet werden. **e-g** Die detektierten FSB-positiven Zellen wurden auch nach weiteren 48 h bzw. 72 h beobachtet und waren selbst 1 Monat nach der FSB-Applikation präsent. **h** Neue FSB-positive Zellen wurden erst nach einer erneuten Injektion des Fluorophors beobachtet (Pfeil). p.i. post Injektion.

5.2.2.4 Langzeituntersuchung der Formation fibrillärer Tau-Aggregate

Die neu etablierte Methode zur in vivo Darstellung fibrillärer Tau-Aggregate ermöglichte es im Weiteren, die fortschreitende Tau-Pathologie in den Retinae der P301S-Tiere über einen längeren Zeitraum zu verfolgen.

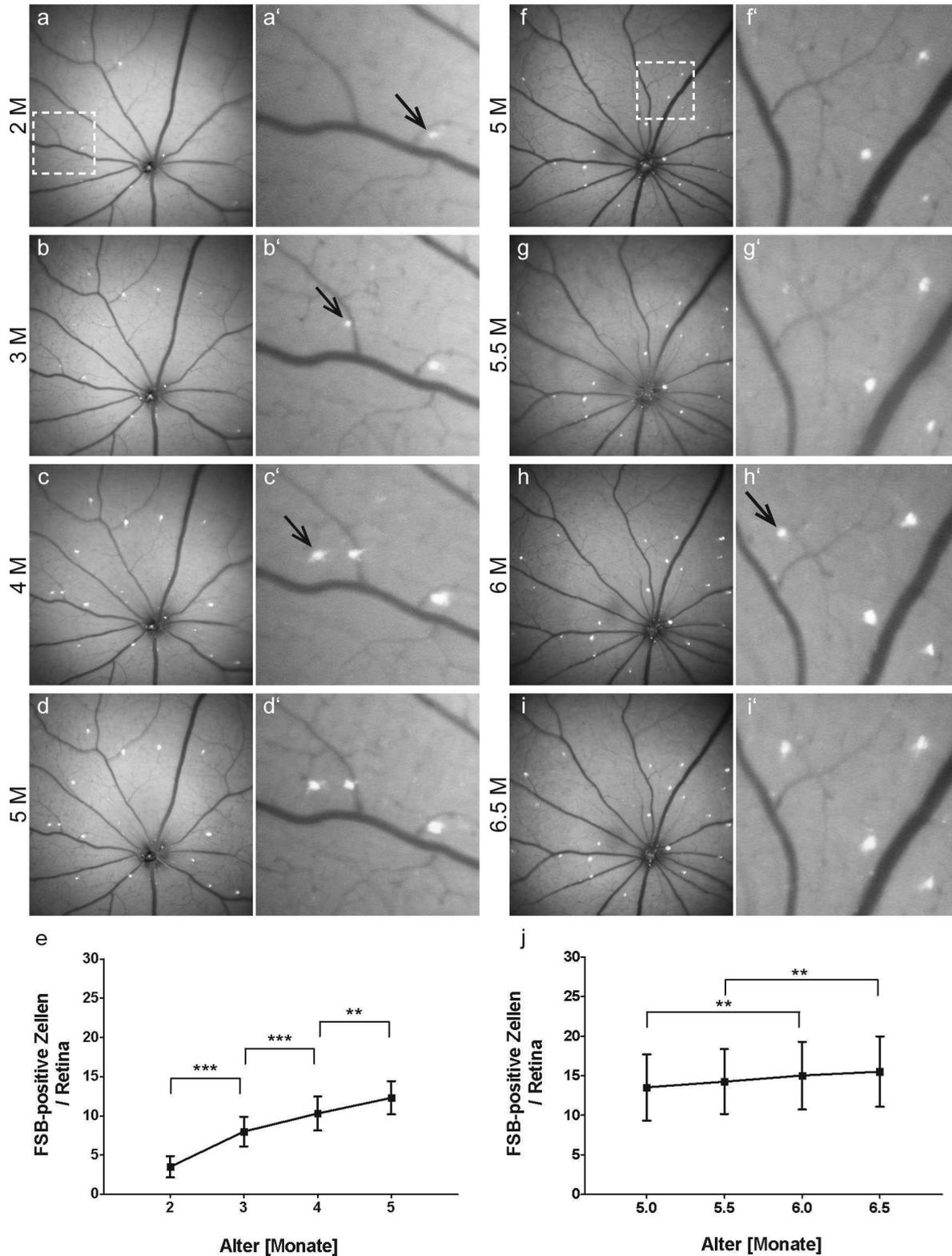


Abbildung 18: Verlauf der Tau-Pathologie in den Retinae von P301S-Mäusen in vivo.

a-d Anreicherung FSB-positiver Zellen in der Retina einer P301S-Maus im Alter von 2 bis 5 Monaten. **f-i** Weiterer Verlauf der Tau-Pathologie in der Retina einer P301S-Maus im Alter von 5 bis

6,5 Monaten. Die Aufnahmen erfolgten im cSLO-Modus (Bildfeld 30°) bei 450 nm Anregung (Emission LP 458). **a'-i'** Vergrößerungen der hervorgehobenen Bereiche in **a** und **f**, die das Auftreten neuer FSB-positiver Zellen über die Zeit verdeutlichen (Pfeile) **e, j** Quantifizierung der Anzahl FSB-positiver Zellen pro Retina im Alter von 2 bis 5 Monaten bzw. 5 bis 6,5 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 10 Retinae (n = 5 Mäuse) ± Standardabweichung **P < 0.01; ***P < 0.001

Die in vivo Untersuchungen erfolgten einmal monatlich an homozygoten P301S-Mäusen zwischen 2 und 5 Monaten (n = 5), (Abbildung 18 a-e) und in einem zweiten Parallelexperiment zwischen 5 und 6.5 Monaten im Abstand von 2 Wochen (n = 4), (Abbildung 18 f-j). In beiden Experimenten wurde 24 - 48 h vor jeder Aufnahme FSB systemisch appliziert. Der speziell gefertigte Maushalter ermöglichte dabei die präzise Orientierung und Positionierung der Tiere vor der optischen Linse (Abbildung 7 b). Dies erlaubte das repetitive Imaging desselben Retina-Bereichs und die Detektion von neu erscheinenden FSB-positiven Zellen über diese Untersuchungszeiträume. Die Quantifizierung zeigte einen konstanten Anstieg der Anzahl FSB-positiver Zellen im Alter von 2 M (3.5 ± 1.3 , MW ± SD) bis 5 M (12.3 ± 2.1) (Abbildung 18 e). Dieser kontinuierliche Anstieg in der Anzahl FSB-positiver Zellen konnte weiterhin in der zweiten Kohorte gealterter P301S-Tiere zwischen 5 M (13.5 ± 4.2) und 6.5 M (15.5 ± 4.4) beobachtet werden (Abbildung 18 j). Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den monatlichen Messpunkten wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholung angewandt. Bemerkenswerterweise führte die beobachtete Anreicherung fibrillärer Tau-Aggregate zu keinem Verlust einzelner FSB-positiver Signale über die Zeit, was auf den Untergang der markierten Nervenzellen hingedeutet hätte.

5.2.2.5 Ex vivo Analyse der Bildung fibrillärer Tau-Aggregate

Um den in vivo beobachteten Verlauf der Bildung fibrillärer Tau-Aggregate zu untermauern, wurden diese auch ex vivo in retinalen Wholemounts der P301S-Mäuse quantifiziert (Abbildung 19 a). Hierzu wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die sowohl positiv für den Antikörper AT8 als auch für das Fluorophor FSB waren (Abbildung 19 b). Übereinstimmend mit den in vivo Daten wurde dabei ein konstanter Anstieg der Anzahl von FSB-positiven Zellen in homozygoten P301S-Tieren gefunden. Der statistische Vergleich der Kohorten (n = 5-6) im Alter von 2 M (1.1 ± 0.1 , MW ± SD), 4 M (2.7 ± 0.6), 5 M (3.1 ± 0.6) und 6.5 M (3.5 ± 0.6) erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse (Abbildung 19 c). Heterozygote P301S-Mäuse im Alter von 14 Monaten entwickelten im Vergleich zu den homozygoten Tieren eine deutlich schwächer ausgeprägte Pathologie (n = 5, 1.0 ± 0.2). Interessanterweise schien dabei die

retinale Pathologie der kortikalen Pathologie voranzugehen. So zeigten sich im Alter von 2 Monaten bereits die ersten fibrillären Tau-Aggregate in den Retinae homozygoter P301S-Tiere, wohingegen nur sehr schwache Immunoreaktivität gegen hyperphosphoryliertes Tau (AT8) im zerebralen Cortex detektiert werden konnte (Abbildung 19 d). Zahlreiche AT8-positive Neurone und eine intensive Färbung des Neuropils im Cortex wurden erst in älteren homozygoten P301S-Tieren gefunden, wie am Beispiel einer 5 Monate alten Maus gezeigt (Abbildung 19 e).

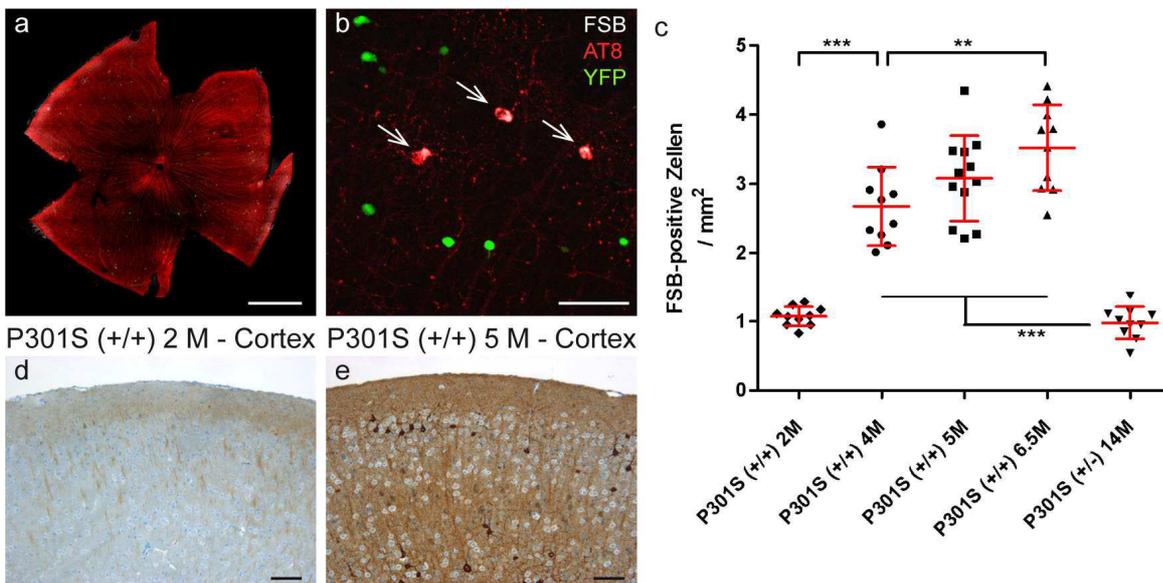


Abbildung 19: Verlauf der Tau-Pathologie in der Retina der P301S-Linie ex vivo.

a, b Immunohistochemische Färbungen von retinalen Wholemounts von P301S- und P301S x YFP-Mäusen mit dem Antikörper AT8 gegen hyperphosphoryliertes Tau (rot) und dem Fluorophor FSB (weiß). In grün erscheinen YFP-positive RGC. **c** Quantifizierung der FSB-positiven Zellen homozygoter und heterozygoter P301S- und P301S x YFP-Mäuse in retinalen Wholemounts in verschiedenen Altersstufen (n = 5 - 6). Einzelne Datenpunkte zeigen die Anzahl FSB-positiver Zellen einer Retina normalisiert auf die Fläche. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. **P < 0.01; ***P < 0.001. **d, e** Paraffinschnitte des Cortex homozygoter P301S-Tiere im Alter von 2 und 5 Monaten gefärbt mit dem Antikörper AT8 (DAB-Färbung, braun) und Hämatoxylin (blau). Maßstab: 1mm (**a**), 100 µm (**b, d, e**)

5.2.2.6 Langzeituntersuchungen von Effekten therapeutischer Wirkstoffe auf die Formation fibrillärer Tau-Aggregate

Das vorgestellte Verfahren zur in vivo Langzeituntersuchung der Retinae von P301S-Tieren ermöglichte erstmals eine Verlaufskontrolle von Therapieeffekten auf die Bildung fibrillärer Tau-Aggregate. Konkret wurden dabei zwei Kohorten homozygoter P301S-Mäuse (n = 5-6) mit den GSK3-Inhibitoren NP12 (200 µg/g Körpergewicht) und NP103 (20 µg/g

Körpergewicht) zwischen 2 und 5 Monaten täglich p.o. behandelt. Um den Verlauf der Pathologie abhängig von der Behandlung zu verfolgen, wurde den Tieren während dieses Zeitraums einmal monatlich FSB i.p. verabreicht und 24 - 48 h danach die cSLO-Untersuchungen durchgeführt. Die Anzahl der fibrillären Tau-Aggregate pro Retina in den behandelten und unbehandelten Kohorten wurde analog zu der beschriebenen Vorgehensweise in Kapitel 5.2.2.4 quantifiziert (Abbildung 20 a, c).

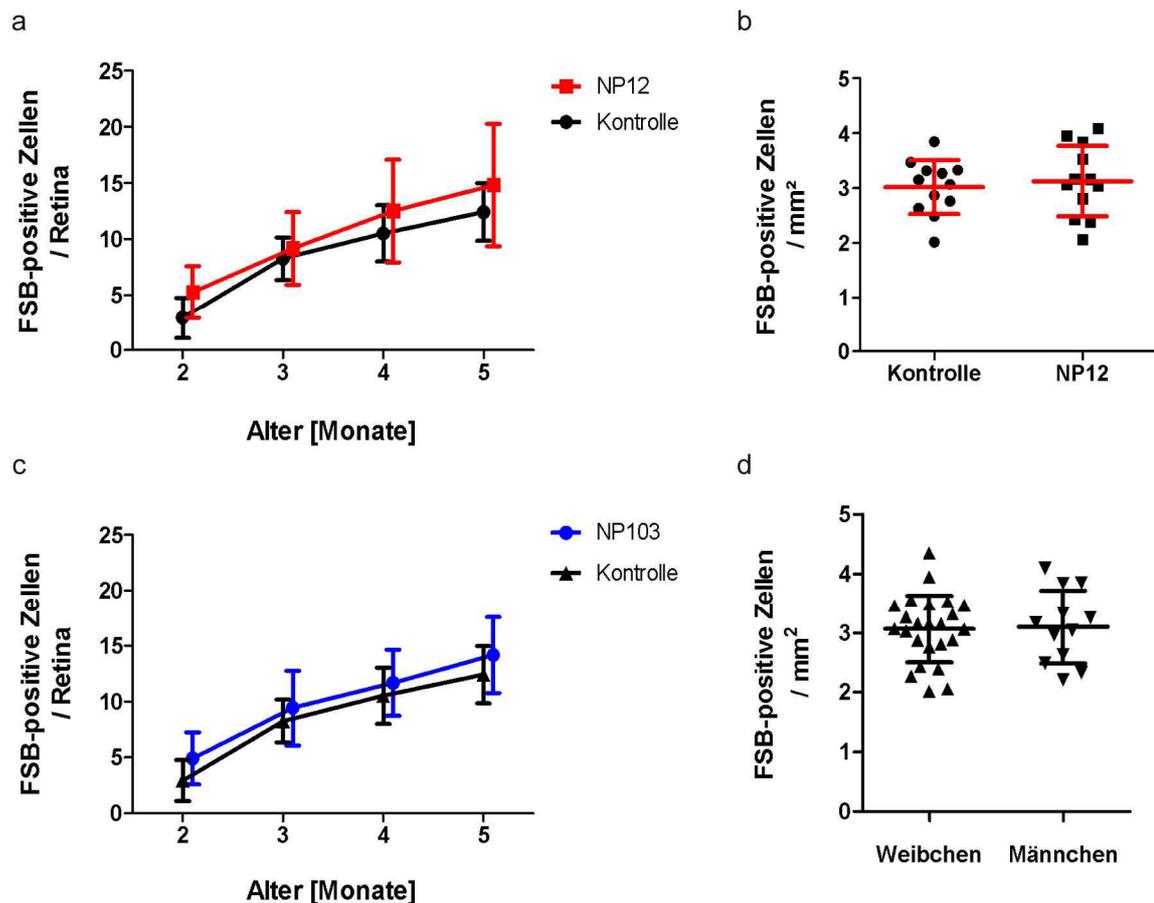


Abbildung 20: Verlaufskontrolle von Therapieeffekten auf die Bildung fibrillärer Tau-Aggregate.

a-d Quantifizierung der FSB-positiven Zellen in den Retinae von P301S-Mäusen, die mit NP12 oder NP103 behandelt wurden bzw. unbehandelt blieben. Die in vivo und ex vivo Quantifizierungen wurden analog zu den Kapiteln 5.2.2.4 und 5.2.2.5 durchgeführt.

a Anreicherung der FSB-positiven Zellen in den Retinae NP12-behandelter (rot) und unbehandelter (schwarz) P301S-Tiere zwischen 2 und 5 Monaten (n = 5 - 6). **b** Ex vivo Quantifizierung der Anzahl FSB-positiver Zellen in Retina-Wholemounds der untersuchten Kohorten aus **a** nach der Perfusion im Alter von 5 Monaten. **c** Anreicherung FSB-positiver Zellen in den Retinae von NP103-behandelten (blau) und unbehandelten (schwarz) P301S-Mäusen zwischen 2 und 5 Monaten (n = 5 - 6). **d** Vergleich der Anzahl FSB-positiver Zellen in retinalen Wholemounts von weiblichen (n = 12) und männlichen (n = 6) P301S-Tieren (5 M). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Einzelne Datenpunkte in **b** und **d** stehen für die Anzahl FSB-positiver Zellen einer Retina normalisiert auf die Fläche.

Die NP12-behandelte Kohorte zeigte dabei einen konstanten Anstieg der Anzahl FSB-positiver Zellen pro Retina zwischen 2 M ($5,3 \pm 2,3$, MW \pm SD) und 5 M ($14,8 \pm 5,4$). Im Vergleich zu dem Anstieg bei unbehandelten P301S-Tieren zwischen 2 M ($3,5 \pm 1,3$) und 5 M ($12,3 \pm 2,1$) ergab dies keinen signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf (getestet durch zweifache Varianzanalyse) (Abbildung 20 a). Die NP103-behandelte Kohorte zeigte ebenfalls einen konstanten Anstieg der Anzahl FSB-positiver Zellen pro Retina zwischen 2 M ($4,9 \pm 2,3$) und 5 M ($14,2 \pm 3,4$), wodurch sich jedoch auch kein signifikanter Unterschied zum Verlauf der Pathologie in der Kontrollgruppe ergab (Abbildung 20 c). Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurden die NP12- und nicht-behandelten Kohorten nach dem letzten Imaging-Zeitpunkt (5 M) perfundiert, Retina-Wholemounds angefertigt und die FSB-positiven Zellen analog zu Punkt 5.2.2.5 quantifiziert. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der NP12- ($3,1 \pm 0,6$) und der nicht-behandelten ($3,0 \pm 0,5$) Kohorte (Student'scher t-Test) (Abbildung 20 b). Diese Experimente wurden an gemischt-geschlechtlichen Kohorten durchgeführt. Hierdurch ergab sich eine mögliche Fehlerquelle, da Faktoren wie Geschlecht oder auch der genetische Hintergrund oft erheblichen Einfluss auf die pathologische Ausprägung transgener Mausmodelle haben. Deshalb wurde die Anzahl der FSB-positiven Zellen in retinalen Wholemounts von 5 Monate alten P301S-Männchen ($n = 12$; $3,1 \pm 0,6$) und -Weibchen ($n = 6$; $3,1 \pm 0,6$) miteinander verglichen. Hierbei konnte allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (getestet mit Student'schem t-Test) (Abbildung 20 d).

5.2.2.7 OCT-Langzeituntersuchungen an den Retinae von P301S-Tieren

Durch OCT-Messungen sollte ermittelt werden, inwiefern die beschriebene Akkumulation der fibrillären Tau-Aggregate in den Retinae von P301S-Tieren einen Einfluss auf deren generelle Beschaffenheit hat. Dabei wurde mittels eines auf die Papille zentrierten Kreisscans von 12° die Retinadicke zwischen RPE und RNFL an vier verschiedenen Messpunkten ermittelt: temporal (temp), superior (sup), nasal (nas) und inferior (inf) (Abbildung 21 a, b). Die OCT-Scans erfolgten einmal monatlich an Kohorten von P301S- und C57BL/6-Mäusen ($n = 5 - 6$) im Alter von 2 bis 5 Monaten. Bei 2 Monate alten Tieren konnte zunächst kein Unterschied in der Retinadicke zwischen der P301S- (sup: $249,4 \mu\text{m} \pm 4,3$; temp: $246,1 \mu\text{m} \pm 4,2$; nas: $248,1 \mu\text{m} \pm 4,7$; inf: $248,4 \mu\text{m} \pm 4,1$) und C57BL/6-Linie (sup: $249,3 \mu\text{m} \pm 2,5$; temp: $248 \mu\text{m} \pm 3,0$; nas: $246,7 \mu\text{m} \pm 2,7$; inf: $247,1 \mu\text{m} \pm 2,9$) festgestellt werden (getestet durch einfache Varianzanalyse).

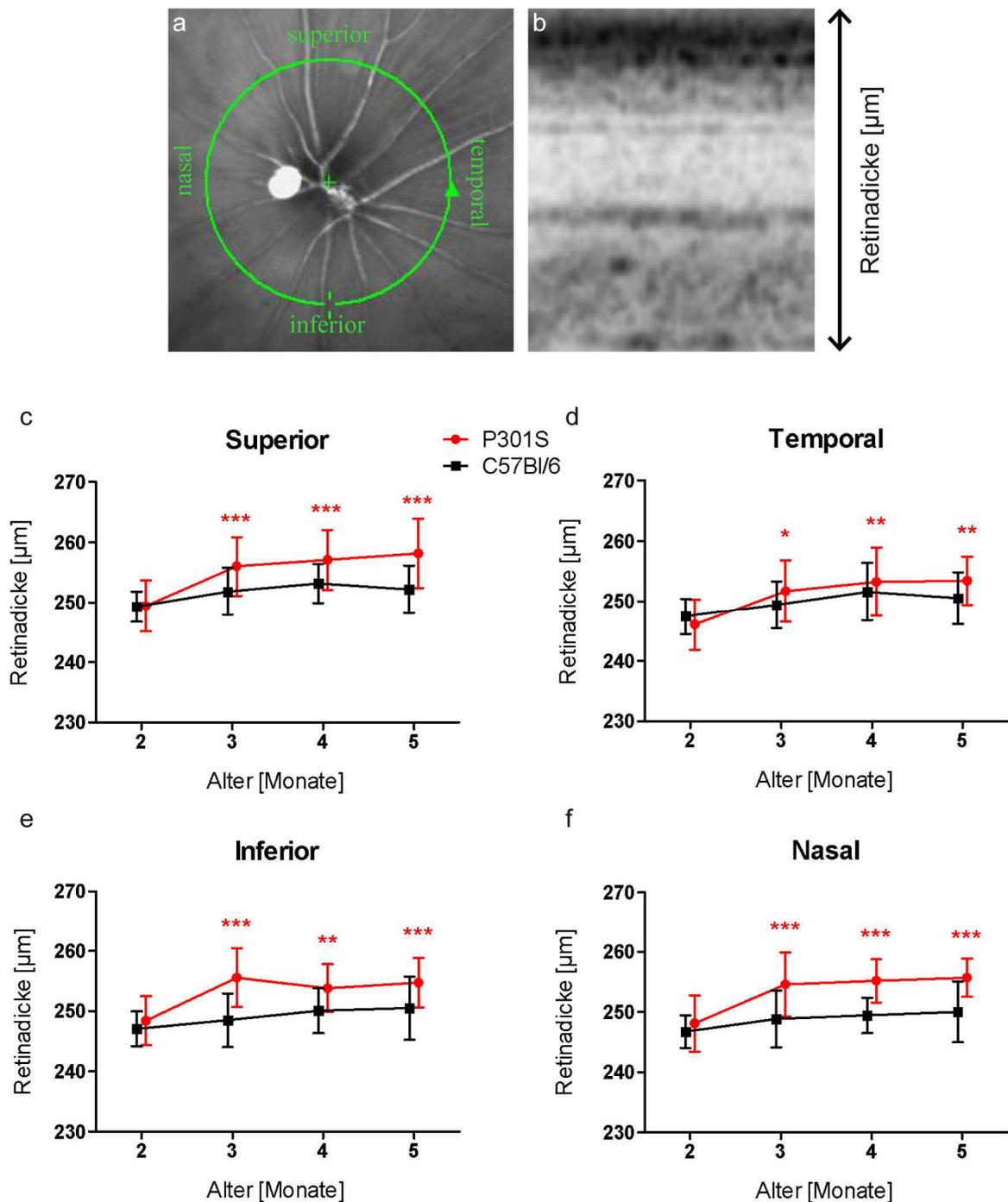


Abbildung 21: OCT-Langzeituntersuchungen der Retinae von P301S-Mäusen.

Langzeituntersuchungen der Retinadicke von P301S- und C57BL/6-Mäusen zwischen 2 und 5 Monaten ($n = 5 - 6$). **a, b** Bestimmung der Retinadicke mittels OCT an vier verschiedenen Messpunkten: superior (**c**), temporal (**d**), inferior (**e**) und nasal (**f**). Die beiden Kohorten P301S (rot) und C57BL/6 (schwarz) wurden unabhängig voneinander getestet und sind nur zur Veranschaulichung in einem Graphen dargestellt. Signifikanzen beziehen sich jeweils auf den ersten Messpunkt bei 2 Monaten (Varianzanalyse mit Messwiederholung). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Um die Retinadicke im zeitlichen Verlauf weiter zu verfolgen, wurden die ermittelten Daten im Folgenden durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholung analysiert (Abbildung 21 c-f). Im Vergleich zu den erhobenen Daten bei 2 Monaten zeigten P301S-Tiere bereits ab einem Alter von 3 Monaten (sup: $256,0 \mu\text{m} \pm 4,9$, $***P < 0,001$; temp: $251,7 \mu\text{m} \pm 5,1$ $*P < 0,05$; nas: $254,6 \mu\text{m} \pm 5,3$ $***P < 0,001$; inf: $255,6 \mu\text{m} \pm 4,9$ $***P < 0,001$) einen signifikanten Anstieg in der Retinadicke. Allerdings wurden keine weiteren signifikanten Veränderungen der Retinadicke von P301S-Mäusen zwischen dem 3., 4. und 5. Lebensmonat festgestellt. Ebenso fand sich bei den C57BL/6-Tieren kein signifikanter Anstieg der Retinadicke zwischen 2 M (sup: $249,3 \mu\text{m} \pm 2,5$; temp: $248 \mu\text{m} \pm 3,0$; nas: $246,7 \mu\text{m} \pm 2,7$; inf: $247,1 \mu\text{m} \pm 2,9$) und 5 M (sup: $252 \mu\text{m} \pm 4,0$; temp: $250 \mu\text{m} \pm 4,4$; nas: $250,0 \mu\text{m} \pm 5,1$; inf: $250,5 \mu\text{m} \pm 5,3$).

5.3 Pathologische Veränderungen in den Retinae von AD- und PSP-Patienten

Neben den bisherigen Untersuchungen an den Retinae transgener Mausmodelle des Morbus Alzheimer sollte der Frage nachgegangen werden, ob fibrilläre Tau-Aggregate oder A β -Plaques in den Retinae von humanen Alzheimer-Patienten zu finden sind. Hierzu wurden histologische Paraffinschnitte der Retinae von AD- und PSP-Patienten (Tabelle 13) auf Ablagerungen von A β oder hyperphosphoryliertem Tau untersucht.

Fall	Krankheit	Stadium (Braak, CERAD)	Alter /Geschlecht	PI	AT8 Retina
1	AD	VI, C	39 / m	7 h	+
2	AD	VI, C	73 / w	20 h	+
3	AD	VI, C	85 / m	27 h	+
4	AD	VI, C	56 / w	22 h	+
5	AD	VI, C	37 / m	24 h	+
6	AD	V, C	79 / m	72 h	-
7	PSP	-	67 / m	40 h	++
8	PSP	-	84 / w	8 h	++
9	Kontrolle	0	53 / m	24 h	-
10	Kontrolle	0	56 / m	72 h	-
11	Kontrolle	I	60 / w	18 h	-
12	Kontrolle	I	57 / m	16 h	-

Tabelle 13: Untersuchte humane Fälle

AD, Morbus Alzheimer; w, weiblich; m, männlich; PI, Postmortalintervall; PSP, progressive supranukleäre Blickparese; -, keine AT8-positiven Zellen; +, vereinzelte AT8-positiv Zellen; ++, viele AT8-positiv Zellen. Das Stadium der Alzheimer-Demenz wurde durch histologische Untersuchungen nach den Braak- und CERAD-Kriterien bestimmt (nähere Ausführungen vgl. Kapitel 4.4).

Unter Verwendung des Antikörpers AT8 konnte dabei in fünf von sechs untersuchten AD- und zwei PSP-Patienten hyperphosphoryliertes Tau nachgewiesen werden (Abbildung 22 a-e). Bei beiden Erkrankungen waren vor allem einzelne Zellen der INL sowie die IPL von diesen Ablagerungen betroffen. Bemerkenswerterweise waren auch bei zwei verhältnismäßig jungen Patienten mit Formen familiärer Alzheimer-Demenz (Fall 1 und 5, 39 bzw. 37 Jahre) diese Ablagerungen in einzelnen Zellen der INL (Abbildung 22 b, b') zu beobachten.

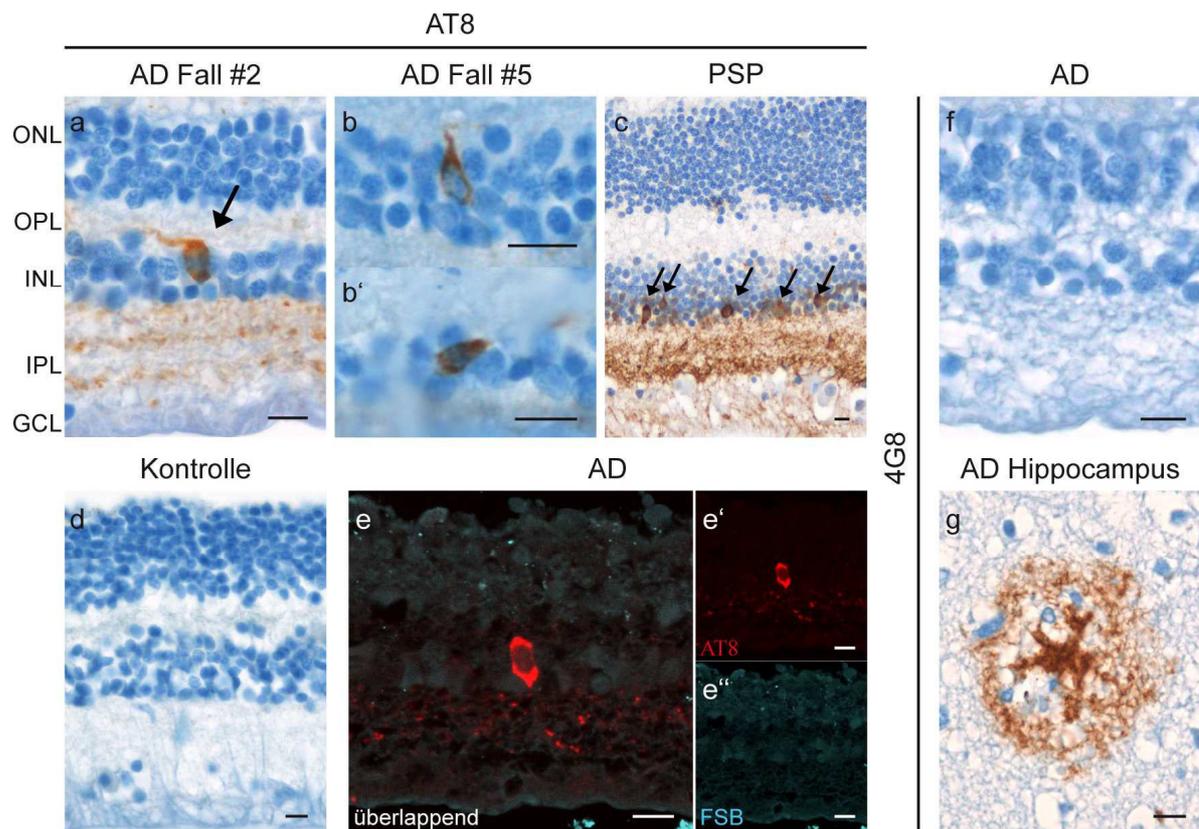


Abbildung 22: Pathologische Veränderungen in den Retinae von humanen AD- und PSP-Fällen.

Exemplarische vertikale Paraffinschnitte der Retinae und des Gehirns von verstorbenen Patienten. Die Schnitte wurden mit dem Antikörper AT8 gegen hyperphosphoryliertes Tau (a-d) bzw. 4G8 gegen A β (f, g) (DAB-Färbung, braun) und Hämatoxylin (blau) behandelt. e-e'' Immunhistochemische Färbung der Retina eines AD-Patienten mit AT8 (rot) und FSB (blau). a-e Retinae von AD- und PSP-Patienten mit Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau (Antikörper AT8), vor allem in Zellen der INL (Pfeile) d Kontrollfälle wiesen keine AT8-positiven Ablagerungen auf. e-e'' AT8-positive Ablagerungen in den AD-Retinae konnten nicht mit FSB markiert werden. f Die Retinae von AD-Patienten zeigten keine 4G8-positiven Ablagerungen von A β , während im Hippocampus dieser Patienten eindeutig A β -Plaques gefunden wurden (g). ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht. AD, Morbus Alzheimer; PSP, progressive supranukleäre Blickparese. Maßstab: 10 μ m

Im Gegensatz zu den untersuchten AD-Fällen wiesen die Retinae der PSP-Patienten eine zusätzliche AT8-positive Färbung in der RNFL auf und zeigten generell eine weitaus intensivere Färbung als die Retinae der AD-Patienten (Abbildung 22 c). Die Retinae von Patienten ohne neuropathologische Auffälligkeiten wiesen im Vergleich dazu kein hyperphosphoryliertes Tau in der Retina auf (Abbildung 22 d).

Um zu klären, ob es sich bei dem detektierten hyperphosphorylierten Tau um fibrilläre Tau-Aggregate handelt, wurden die Retina-Paraffinschnitte der AD- und PSP-Patienten mit dem Fluorophor FSB und dem Antikörper AT8 untersucht. Dabei war es nicht möglich, die AT8-positiven Ablagerungen in den Retinae auch mit FSB zu markieren (Abbildung 22 e-e"). Zusätzlich wurden mit weiteren Markern versucht fibrilläre Tau-Aggregate in den Retinae der AD- und PSP-Fälle nachzuweisen. Verwendet wurden hierzu Thioflavin-S, die Versilberung nach der Gallyas-Methode sowie immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern AT100, AT180, AT270 und PHF-1, die bevorzugt fibrilläre Tau-Aggregate erkennen. Allerdings konnte mit keinem dieser Marker ein positiver Nachweis für fibrilläres Tau erbracht werden. In mitgeführten humanen Gehirnschnitten von Alzheimer-Patienten konnten die fibrillären Tau- und A β -Aggregate allerdings mit allen verwendeten Markern nachgewiesen werden.

Wie schon in den beschriebenen Experimenten an transgenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer (Kapitel 5.2.1), konnten auch in den humanen Retinae von AD-Patienten keinerlei Ablagerungen von A β durch die spezifischen Antikörper 4G8 bzw. NAB228 nachgewiesen werden (Abbildung 22 f). Mitgeführte Paraffinschnitte vom Hippocampus der AD-Patienten zeigten hingegen eindeutig extrazelluläre A β -Plaques (Abbildung 22 g). Wie zuvor erörtert, wurden beim Versuch fibrilläre Tau-Aggregate in den AD-Retinae nachzuweisen die Marker FSB, Thioflavin-S und Gallyas-Silver verwendet. Diese Marker erkennen allerdings auch fibrilläre A β -Plaques. Jedoch resultierten diese Experimente in keiner positiven Färbung, die auf A β -Plaques in den Retinae der AD-Fälle hingedeutet hätte.

6 Diskussion

Morbus Alzheimer ist die am weitesten verbreitete neurodegenerative Erkrankung mit fatalen Folgen für die Betroffenen, deren soziales Umfeld und mit erheblichen sozioökonomischen Auswirkungen. Aktuell gilt die Krankheit als unheilbar, weshalb intensiv an den Ursachen und einer möglichen Therapie geforscht wird. Ein zentrales Problem in der Identifizierung und Validierung von neuen Therapieansätzen des Morbus Alzheimer liegt in der unzureichenden Diagnose begründet. Aktuell ist eine eindeutige Diagnose, mit Abgrenzung zu anderen Demenzformen, auf histologische Untersuchungen am Gehirngewebe post mortem beschränkt (Ballard et al, 2011; Braak et al, 2006). Man geht davon aus, dass erste pathologische Veränderungen im Gehirn der Alzheimer-Patienten jedoch bereits jahrzehntelang vor den klinischen Symptomen auftreten (Bateman et al, 2012; Jack et al, 2010). Deshalb wird die Krankheit im Regelfall erst zu einem Zeitpunkt diagnostiziert, bei dem bereits irreversible Schäden an Synapsen, Nervenzellen und ganzen Arealen des Gehirns vorliegen. Die zu späte Erkennung der Krankheit und der dadurch bedingte verzögerte Therapiebeginn werden als entscheidende Gründe für das Scheitern von klinischen Studien mit vielversprechenden Wirkstoffen angesehen, wie beispielsweise jüngst dem A β -Antikörper Bapineuzumab (Pfizer). Ein Diagnoseverfahren zur frühzeitigen Erkennung der Alzheimer-Demenz und für eine klare Abgrenzung von anderen neurodegenerativen Erkrankungen ist deshalb ebenso essentiell, wie die Etablierung neuer Therapieansätze. Dieses dringend benötigte Frühdiagnoseverfahren ist allerdings abhängig von verlässlichen und krankheitsspezifischen Biomarkern. Bei der Alzheimer-Demenz liegt die Hoffnung vor allem in der Detektion veränderter Spiegel von A β und Tau im zentralen Nervensystem oder anderen Bereichen des Körpers (Barber, 2010).

In dieser Dissertation sollte ein Verfahren entwickelt werden, das einen Nachweis von A β -Plaques bzw. hyperphosphoryliertem Tau in den Retinae von Mausmodellen der Alzheimer-Demenz ermöglicht. Im Zuge dessen wurde eine Methode zur in vivo Darstellung von fibrillären Tau-Aggregaten in der Mausretina etabliert. Dieses Verfahren ermöglichte erstmals die Langzeituntersuchung der Bildung fibrillärer Tau-Aggregate im Mausmodell. Diese Methode konnte auch zur Therapiekontrolle von Wirkstoffen eingesetzt werden, die die Bildung fibrillärer Tau-Aggregate aufhalten sollen. Darüber hinaus wurde überprüft, ob in den Retinae von Alzheimer-Patienten A β - oder Tau-Aggregate zu finden sind und inwiefern diese als Biomarker für ein potentiell Diagnoseverfahren am Menschen in Frage kommen.

6.1 Retinale A β -Pathologie in transgenen Mausmodellen des Morbus Alzheimer

Bisherige Studien, die sich mit der retinalen Pathologie in Mausmodellen des Morbus Alzheimer beschäftigten, konzentrierten sich im Wesentlichen auf den Nachweis von A β . In den letzten Jahren wurden mehrere Arbeiten veröffentlicht, in denen A β -Plaques in den Retinae von DeltaE9- und Tg2576-Mäusen nachgewiesen wurden (Koronyo-Hamaoui et al, 2011; Koronyo et al, 2012; Liu et al, 2009; Perez et al, 2009). Weitere Studien an denselben Mauslinien konnten zwar eine erhöhte Expression von APP in Zellen der GCL und INL nachweisen, jedoch wurden nur geringe Mengen des A β -Peptids und keine Anzeichen für A β -Plaques in den Retinae gefunden (Dutescu et al, 2009; Ning et al, 2008). Als möglicher Grund für die geringe retinale A β -Produktion, im Vergleich zum Gehirn der Tiere, wird eine verminderte Expression der β -Sekretase in der Retina gesehen (Dutescu et al, 2009; Lehman et al, 2003).

Der Nachweis von A β -Plaques in den Retinae von Tg2576- und DeltaE9-Mäusen (Koronyo-Hamaoui et al, 2011; Koronyo et al, 2012; Liu et al, 2009; Perez et al, 2009) konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Zum einen wurden Paraffinschnitte und Wholemout-Präparate der Retinae dieser Mausmodelle immunhistologisch mit verschiedenen A β -Antikörpern (4G8, 6E10 und NAB228) untersucht. Zum anderen wurden die Retinae mit mehreren Fluorophoren (Methoxy-X04, BSc4090 und FSB) gefärbt, die an fibrilläre Amyloid-Ablagerungen binden. Jedoch gelang weder mit den aufgezählten Antikörpern noch mit den Fluorophoren ein positiver Nachweis von A β -Plaques in den Retinae der DeltaE9-, Tg2576-, APPPS1- und 3xTg-AD-Linie. Bemerkenswerterweise benutzten die Studien von Liu et al (2009) und Koronyo-Hamaoui et al (2011) zum Nachweis der retinalen A β -Plaques dieselben Antikörper 6E10 bzw. 4G8, die auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen. Liu et al (2009) wiesen im Tg2576-Mausmodell retinale A β -Plaques mit dem Antikörper 6E10 in einer Konzentration von 1:100 nach, eine Verdünnung, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In der Studie von Koronyo-Hamaoui et al (2011) erfolgte der Nachweis von retinalen A β -Plaques unter anderem durch den Antikörper 4G8 in einer Endkonzentration von 1:100. Die von uns durchgeführten, histologischen Experimente mit dem Antikörper 4G8 in derselben Verdünnung (1:100) resultierten in einer unspezifischen Färbung des gesamten Retinagewebes. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit mit höheren Konzentrationen desselben Antikörpers (1:1000) gearbeitet. Abgesehen von den verwendeten Antikörpern finden sich weitere Unterschiede in den immunhistochemischen Protokollen der vorliegenden Arbeit und den diskutierten Publikationen (Koronyo-Hamaoui et al, 2011; Koronyo et al, 2012; Liu et al, 2009; Perez et

al, 2009). Diese Unterschiede beruhen zum Großteil darauf, dass die aufgeführten Studien mit Kryostatschnitten anstatt den von uns verwendeten Paraffinschnitten arbeiteten. Hieraus ergaben sich unter anderem verschiedene Vorgehensweisen in Fixation, Einbettung und Vorbehandlung der Retinae. Deshalb lässt sich nicht endgültig ausschließen, dass die Diskrepanzen zwischen den von uns gezeigten Negativergebnissen und den aufgeführten Publikationen auf methodischen Unterschieden beruhen. Allerdings bleibt zu betonen, dass in der vorliegenden Arbeit mit histologischen Methoden gearbeitet wurde, die in der Routinediagnose des Morbus Alzheimer etabliert sind, wobei vor allem die 4G8-Färbung an Paraffinschnitten als Standardmethode hervorzuheben ist. Mit histologischen Verfahren, die am Hirngewebe der transgenen Linien DeltaE9, Tg2576, APPPS1 und 3xTg-AD zu positiven Signalen führten, gelang somit kein Nachweis von A β -Plaques in den Retinae dieser Mäuse. Jedoch konnte in retinalen Wholemouts gealterter APPPS1- und Tg2576-Tiere ein 6E10-positives, intrazelluläres Signal in der GCL detektiert werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Befunden aus der Literatur zu gealterten Tieren der Linie Tg2576 und DeltaE9 überein (Dutescu et al, 2009; Ning et al, 2008) und ist sehr wahrscheinlich durch eine APP-Akkumulation als Folge der Überexpression und weniger durch eine intrazelluläre A β -Ablagerung bedingt. Da unser verwendeter Antikörper 6E10 jedoch gegen die A β -Domäne des APP gerichtet ist, kann diese Frage nicht eindeutig beantwortet werden.

Des Weiteren wird in den Studien von Koronyo-Hamaoui et al (2011) und Koronyo et al (2012) ein Verfahren zur in vivo Darstellung der von ihnen entdeckten retinalen A β -Plaques im DeltaE9-Mausmodell beschrieben. Hierfür wurde DeltaE9-Mäusen der Farbstoff Curcumin über fünf Tage in Folge i.v. verabreicht und anschließend die Retinae der Tiere mittels einer speziell für Mäuse konzipierten Kamera (Micron II) untersucht. In den Retinae der DeltaE9-Mäuse wurden dabei kleine, fluoreszente Punkte detektiert, die von den Autoren als A β -Plaques interpretiert wurden. In der vorliegenden Arbeit sollte ein in vivo Nachweis von retinalen A β -Plaques analog zu den Arbeiten von Koronyo-Hamaoui et al (2011) und Koronyo et al (2012) mit den A β -affinen Farbstoffen FSB und BSc4090 erbracht werden. Diese Experimente führten jedoch zu keinem positiven Nachweis von A β -Plaques in den Retinae von DeltaE9-, Tg2576-, APPPS1- oder 3xTg-AD-Mäusen und stimmen somit mit unseren Negativbefunden aus den histologischen Untersuchungen überein. Auf Grund der geringen Spezifität von Curcumin für fibrilläre Proteinaggregate bevorzugten wir die Fluorophore FSB und BSc4090 für unsere in vivo Experimente. Neben der hohen Affinität zu fibrillären A β - und Tau-Aggregaten, erfüllten diese Fluorophore noch weitere wichtige Kriterien: Dazu gehörten neben einer geringen Toxizität die Anregbarkeit der Fluorophore mit Licht von Wellenlängen > 400 nm, da kürzere Wellenlängen von der Linse verstärkt

absorbiert werden (Lerman, 1987). Eine weitere wichtige Eigenschaft der Fluorophore ist deren Gängigkeit über die Blut-Hirn- bzw. Blut-Retina-Schranke. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnten durch eine einmalige Applikation von Bsc4090 und FSB A β -Plaques im Mauscortex in vivo markiert werden (Abbildung 10), (Boländer et al, 2012; Higuchi et al, 2005). Bei dem Versuch A β -Plaques in den Retinae der DeltaE9-, Tg2576-, APPPS1- und 3xTg-AD-Mäuse nachzuweisen, wurden FSB und BSc4090 auf dieselbe Weise verabreicht, wie zuvor für die erfolgreiche in vivo Markierung der A β -Plaques im Gehirn. Die verabreichte Konzentration der Fluorophore und die Wartezeit zwischen Applikation und Retinascan sind demnach als Fehlerquelle für die gescheiterte Detektion der A β -Plaques auszuschließen. Für diese in vivo Experimente wurde angenommen, dass die Fluorophore die Blut-Retina-Schranke mit einer vergleichbaren Effizienz passieren wie die Blut-Hirn-Schranke.

Entscheidend für unsere Versuche eines in vivo Nachweises von A β -Plaques in den Retinae der transgenen Mausmodelle war der Ausschluss unspezifischer Signale bedingt durch autofluoreszente Ablagerungen. Diese Punkte erhöhter Autofluoreszenz kommen bekannterweise in den Retinae gealterter Mäuse vor und treten bei in vivo Aufnahmen der Retina deutlich als kleine fluoreszente Punkte hervor (Xu et al, 2008). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Bilder der Mausretina vor und nach der Gabe der Fluorophore aufgenommen und miteinander verglichen. Nach der Applikation von FSB oder BSc4090 wurden allerdings keine neuen fluoreszenten Signale detektiert, die auf A β -Plaques in den Retinae der untersuchten Mausmodelle hingewiesen hätten. Die Diskrepanz zwischen diesen Negativbefunden und dem in vivo Nachweis von retinalen A β -Plaques von Koronyo-Hamaoui et al (2011) und Koronyo et al (2012) könnte dadurch erklärt werden, dass beide Arbeiten die diskutierten Signale erhöhter Autofluoreszenz in der Mausretina nicht berücksichtigen. Auffälligerweise beschreiben Koronyo-Hamaoui et al (2011) die Anregung von Curcumin bei einer Wellenlänge von 550/25 nm und die Detektion bei 605/70 nm. Diese verwendeten Bandpassfilter sind mit dem Anregungs- und Emissionsspektrum von Curcumin nicht vereinbar (Bong, 2000). Allerdings können die in der Literatur beschriebenen autofluoreszenten Aggregate in der Mausretina mit diesen Anregungs- und Emissionsfiltern detektiert werden (Xu et al, 2008).

Zusammenfassend führten unsere histologischen Untersuchungen und in vivo Experimente zu keinem positiven Nachweis von retinalen A β -Plaques in den untersuchten Mausmodellen des Morbus Alzheimer (APPPS1, 3xTg-AD, DeltaE9 und Tg2576). Dabei kann das Alter der Tiere diese negativen Befunde nicht erklären. Alle untersuchten Mäuse hatten das Alter überschritten, bei dem laut Literatur A β -Plaques im Gehirn (APPPS1, 3xTg-AD) bzw. in der Retina und im Gehirn (DeltaE9, Tg2576) zu erwarten gewesen wären (vgl. dazu Tabelle 14).

Linie	Pathologie im Gehirn	Literaturangaben zur Retinopathie	Eigene Befunde zur Retinopathie
DeltaE9	A β -Plaques ab 6 M (Jankowsky et al, 2004)	A β -Plaques ab 2 M (Koronyo-Hamaoui et al, 2011) A β -Plaques ab 12 M (Perez et al, 2009) keine A β -Plaques (Dutescu et al, 2009; Ning et al, 2008)	keine A β -Plaques ex vivo: 16-28 M (n = 8) in vivo: 16-24 M (n = 7)
Tg2576	A β -Plaques ab 12 M (Hsiao et al, 1996)	A β -Plaques ab 14 M (Liu et al, 2009) keine A β -Plaques (Dutescu et al, 2009; Ning et al, 2008)	keine A β -Plaques ex vivo: 16-23 M (n = 5) in vivo: 16-22 M (n = 5)
APPS1	A β -Plaques ab 2 M (Radde et al, 2006)	keine Literaturangaben	keine A β -Plaques ex vivo: 8-22 M (n = 5) in vivo: 11 M (n = 2)
3xTg-AD	A β -Plaques und hyperphosphoryliertes Tau ab 15 M (Oddo et al, 2003)	keine Literaturangaben	keine A β -Plaques oder hyperphosphoryliertes Tau ex vivo: 21-32 M (n = 5) in vivo: 19-22 M (n = 2)
P301S	hyperphosphoryliertes Tau ab 3 M (Hampton et al, 2010)	fibrilläres Tau ab 6 W (Gasparini et al, 2011)	fibrilläres Tau ab 2 M

Tabelle 14: Retinale Pathologie der untersuchten Mausmodelle laut Literatur und eigene Befunde

6.2 Retinale Tau-Pathologie im Mausmodell und deren in vivo Darstellung

Transgene Mausmodelle des Morbus Alzheimer exprimieren FAD-assoziierte *APP*- oder *PS1*-Mutationen und entwickeln eine dem humanen Alzheimer ähnliche A β -Pathologie. Anders als bei Patienten des Morbus Alzheimer findet man jedoch bei diesen Tiermodellen keine vergleichbare Ausprägung der Tau-Pathologie. Oft werden deshalb in das Genom dieser transgenen Tiermodelle zusätzliche Mutationen des *MAPT*-Gens eingebracht, die man ursprünglich in Fällen der FTDP-17 gefunden hatte (Götz & Ittner, 2008). Ein Beispiel für ein solches Vorgehen stellt die 3xTg-AD-Linie dar, die neben einer *APP*- und *PS1*- auch eine *MAPT*-Mutation (P301L) exprimiert (Oddo et al, 2003). Für spezielle Fragestellungen bezüglich der Rolle der Tau-Pathologie im Morbus Alzheimer werden allerdings auch Linien herangezogen, die ausschließlich FTDP-17 assoziierte Mutationen exprimieren, wie die P301S-Linie. Neben der 3xTg-AD-, war die P301S-Linie in der vorliegenden Arbeit von

besonderem Interesse, da sie das am besten charakterisierte Modell mit retinaler Tau-Pathologie ist (Bull et al, 2012; Gasparini et al, 2011; Magnani et al, 2007).

In den Retinae der 3xTg-AD-Mäuse konnten keine Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau in vivo oder ex vivo nachgewiesen werden. Allerdings gelang erstmals die in vivo Darstellung von fibrillären Tau-Aggregaten in der Retina der P301S-Linie mittels des Fluorophors FSB. Dadurch wurde ein zentrales Ziel dieser Dissertation erfüllt: die Etablierung eines in vivo Nachweisverfahrens von fibrillären Tau-Aggregaten in der Mausretina. Inwiefern sich dieses Nachweisverfahren auf diagnostische Fragestellungen bei humanen Patienten übertragen lässt, wird in Kapitel 6.3 diskutiert. Des Weiteren gelang erstmals die Etablierung einer Methode zur Langzeituntersuchung der Bildung fibrillärer Tau-Aggregate. Um den Wert dieser Experimente einzuordnen, ist es hilfreich die aktuelle Situation in der Literatur zu betrachten: Aktuell erlaubt die Methode der chronischen in vivo 2-Photonen-Mikroskopie die Untersuchung von pathologischen Veränderungen im Cortex transgener Mausmodelle des Morbus Alzheimer. Beispielsweise können so die Formation von A β -Plaques und der damit assoziierte Synapsenverlust über die Zeit verfolgt werden (Bittner et al, 2012; Burgold et al, 2010). Jedoch steht die in vivo Untersuchung fibrillärer Tau-Aggregate im zentralen Nervensystem und assoziierter neurodegenerativer Effekte noch am Anfang. Dieses Defizit beruhte bisher vor allem auf methodischen Problemen. So erhöht die intrazelluläre Lokalisation des fibrillären Taus die Anforderungen an systemisch-applizierbare Fluorophore für die in vivo Markierung dieser Aggregate. Dementsprechend gelang es nur einmal fibrilläre Tau-Aggregate nach einer systemischen Applikation des Fluorophors X-34 im Cortex eines transgenen FTDP-17-Modells (Tg4510) zu markieren und durch in vivo 2-Photonen-Mikroskopie zu untersuchen (de Calignon et al, 2010). Ein vergleichbares chronisches in vivo Imaging, um die Formation von fibrillären Tau-Aggregaten oder die direkte Auswirkung dieser Tau-Aggregate auf die betroffene Nervenzelle und deren Synapsen zu untersuchen, wurde bisher nicht durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Langzeituntersuchung im P301S-Mausmodell ermöglichte somit zum ersten Mal Untersuchungen zur Kinetik der Formation fibrillärer Tau-Aggregate im zentralen Nervensystem.

Hierdurch konnte der vieldiskutierten Frage im Forschungsfeld der Tauopathien nachgegangen werden, inwiefern die Bildung fibrillärer Tau-Aggregate zum Untergang von Nervenzellen führt (Spires-Jones et al, 2011). In unseren Untersuchungen konnte über mehrere Monate ein konstanter Anstieg der Anzahl FSB-positiver Neurone in der Retina beobachtet werden. Allerdings wurde die Bildung neuer Tau-Aggregate von keinem Verlust einzelner FSB-positiver Zellen über die Zeit begleitet, was für den Untergang der markierten

Zellen gesprochen hätte. Für die Vitalität der FSB-positiven RGC sprechen auch die begleitenden histologischen Untersuchungen. Zum einen konnten die FSB-positiven Zellen ausnahmslos mit dem neuronalen Marker NeuN gefärbt und zum anderen keine pathologischen Auffälligkeiten in den dendritischen Bäumen dieser RGC festgestellt werden. Als indirekter Indikator für einen möglichen Nervenzell- oder Synapsenverlust wurde zudem die Retinadicke von P301S-Tieren mittels OCT-Messungen bestimmt. Dabei konnte kein Anzeichen für einen Gewebeverlust im Zeitraum zwischen dem 2. und 5. Lebensmonat beobachtet werden. Entgegen den Erwartungen wurde sogar ein Zuwachs der Retinadicke von P301S-Mäusen zwischen 2 und 3 Monaten festgestellt. Die Messung der Retinadicke mittels OCT zur Untersuchung pathologischer Veränderungen ist mittlerweile eine gängige Methode in verschiedensten Mausmodellen. So zeigte eine frühere Arbeit, dass gewonnene Daten von in vivo OCT-Untersuchungen mit einem vergleichbaren Gerät (HRA Spectralis) bestens mit histologischen Dickenmessungen der Mausretina korrelieren (Fischer et al, 2009). All diese Befunde sprechen dafür, dass die Bildung von fibrillären Tau-Aggregaten innerhalb des untersuchten Zeitraums von 3 Monaten nicht ausreichend ist, um einen Untergang von Neuronen auszulösen, wie er in Tauopathien wie der FTDP-17 beobachtet wird. Diese Schlussfolgerung wird weiterhin durch eine vorangegangene Studie unterstützt, bei der die Anzahl RGC in gealterten P301S-Mäusen quantifiziert und dabei kein Unterschied zur Kontrollkohorte festgestellt wurde (Gasparini et al, 2011). Jüngste Untersuchungen im Cortex der Tg4510-Linie führten zu vergleichbaren Befunden: Hier wurden ebenfalls fibrilläre Tau-Aggregate in großer Zahl identifiziert. Es fanden sich jedoch keine Anzeichen dafür, dass Nervenzellen, die fibrilläre Tau-Aggregate bilden auch daran zu Grunde gehen (de Calignon et al, 2010). Eine weitere Studie zeigte, dass bei Tg4510-Tieren mit pathologisch bedingten kognitiven Ausfällen eine Unterdrückung der Expression des Tau-Transgens die Gedächtnisleistung und Neuronenzahl stabilisiert (Santacruz et al, 2005). Diese Arbeiten weisen darauf hin, dass nicht fibrilläre, sondern eine lösliche Vorstufe der Tau-Aggregate für die neurotoxische Wirkung verantwortlich ist.

Weiterhin bietet der hier vorgestellte Ansatz zur Langzeituntersuchung fibrillärer Tau-Aggregate erstmalig die Möglichkeit Therapieeffekte „live“ zu verfolgen. Dies sollte am Beispiel der Wirkung von zwei GSK3-Inhibitoren gezeigt werden. Das Enzym GSK3 wurde als therapeutisches Ziel ausgewählt, da es sich um ein zentrales Schlüsselenzym in der Phosphorylierung des Tau-Proteins handelt. Diese Phosphorylierung gilt als initialer Schritt für die Bildung von fibrillären Tau-Aggregaten (Hanger et al, 1992; Lucas et al, 2001). Das Enzym ist außerdem von besonderem Interesse, da es durch A β über den Insulin- oder Wnt-Signalweg überaktiviert werden kann. Somit wird GSK3 als mögliches Verbindungsglied

zwischen A β und Tau in der Alzheimer-Pathogenese angesehen (Alvarez et al, 1999; Busciglio et al, 1995; Hernandez et al, 2009; Magdesian et al, 2008; Townsend et al, 2007). Mehrere präklinische Studien zeigten bereits eine Verminderung der Tau-Pathologie in verschiedenen transgenen Mausmodellen durch die Behandlung mit dem unspezifischen GSK3-Inhibitor Lithium (Caccamo et al, 2007; Nakashima et al, 2005; Shimada et al, 2012). Für einen möglichen Therapieansatz sind GSK3-spezifische Inhibitoren jedoch einem unspezifischen Inhibitor wie Lithium vorzuziehen. Deshalb wurden die Experimente in unserer Arbeit mit den GSK3-Inhibitoren NP12 und NP103 (Firma Noscira) durchgeführt. Während sich NP103 aktuell noch in der präklinischen Phase befindet, war vor allem NP12 (Tideglusib) ein interessanter Wirkstoff für eine Inhibition der Bildung fibrillärer Tau-Aggregate. Die Effektivität des Wirkstoffs NP12 wurde zum Zeitpunkt des Versuchs in einer klinischen Phase II b an Alzheimer- und PSP-Patienten getestet.

Für das Therapieexperiment wurden P301S-Mäuse zwischen 2 und 5 Monaten mit den GSK3-Inhibitoren behandelt und einmal monatlich nach der Applikation von FSB in vivo untersucht. Es konnten dabei keine signifikanten Unterschiede auf die Bildung fibrillärer Tau-Aggregate zwischen den NP12- bzw. NP103-behandelten und unbehandelten P301S-Tieren beobachtet werden. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu einer früheren Studie, in der eine Reduktion der Tau-Ablagerungen im Gehirn von NP12-behandelten transgenen Tieren beschrieben wurde (Serenio et al, 2009). In der Studie von Serenio et al (2009) und in der vorliegenden Arbeit wurden die transgenen Tiere mit NP12 in derselben Konzentration (200 μ g/g Körpergewicht) und Verabreichungsweise (p.o.) sowie über denselben Zeitraum (3 M) behandelt. Somit können diese Parameter als Fehlerquellen für die unterschiedlichen Befunde ausgeschlossen werden. Der Hauptunterschied in den beiden Arbeiten liegt in den untersuchten Mausmodellen. Während in der vorliegenden Arbeit P301S-Mäuse behandelt wurden, nutzten Serenio et al (2009) die APP_{swe}-tau_{v1w}-Linie. Diese exprimieren eine schwedische Doppelmutation (K670N-M671L) und drei verschiedenen Tau-Mutationen (G272V, P301L und R406W). Die APP_{swe}-tau_{v1w}-Mäuse entwickeln erst ab einem Alter von 9 Monaten Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau (Perez et al, 2005), im Vergleich zu der äußerst aggressiven Aggregation des Tau-Proteins im P301S-Mausmodell, die bereits ab dem 3. Monat im Cortex und ab 6 Wochen in der Retina entsteht (Gasparini et al, 2011; Hampton et al, 2010). Die stärkere Tau-Pathologie der P301S-Linie mag als mögliche Ursache für den gescheiterten Therapieversuch in der vorliegenden Arbeit gelten.

Obwohl mit den verwendeten GSK3-Inhibitoren kein Effekt auf die Bildung fibrillärer Tau-Aggregate beobachtet werden konnte, verdeutlichen diese Experimente das Prinzip nach dem in Zukunft die Wirkungen einzelner Therapeutika über die Zeit in vivo verfolgt werden

können. Experimente dieser Art bieten erhebliche Vorteile im Vergleich zu bisherigen Studien an *MAPT*-transgenen Mäusen, bei denen die Wirksamkeit von Medikamenten getestet wurde. So war eine nicht-invasive Untersuchung von Therapieerfolgen über die Zeit bisher nur durch Verhaltensexperimente möglich. Jedoch spiegelt die hierdurch gemessene kognitive Lernfähigkeit der Tiere nur indirekt die Veränderungen in der Tau-Pathologie wider (Götz & Ittner, 2008). Bezüglich der Tau-Pathologie mussten sich bisherige Therapiestudien stets auf histologische und biochemische Untersuchungen der Versuchskohorten verlassen. Diese Experimente zeigen allerdings nur eine Momentaufnahme des Behandlungserfolgs und unterliegen einem wohlbekanntem und viel diskutierten Problem der Heterogenität der Pathologieausprägung von Tier zu Tier. Durch die Möglichkeit den Verlauf der Tau-Pathologie einzelner Tiere über die Zeit zu verfolgen, wird dieses Problem kontrollierbar. Aus tierschutzrechtlicher Sicht ist eine nicht-invasive Langzeituntersuchung ebenfalls sehr attraktiv, da die Anzahl der benötigten Tiere für verschiedene Experimente erheblich reduziert werden kann - insbesondere wenn es darum geht verschiedenen Alterskohorten zu untersuchen.

Der hier vorgestellte Ansatz zur Langzeituntersuchung fibrillärer Tau-Aggregate in der Retina bietet zudem neue Möglichkeiten interessante Fragestellungen im Kontext der intrazellulären Tau-Aggregation zu verfolgen. So konnte in einer Studie kürzlich gezeigt werden, dass hyperphosphoryliertes und aggregiertes Tau zu einem reduzierten axonalen Transport im optischen Nerv der P301S-Linie führt (Bull et al, 2012). Weiterhin demonstrierte diese Arbeit auch eine erhöhte Anfälligkeit der RGC dieser Mäuse für exzitotoxischen Schaden, der künstlich durch eine intravitreale Injektion von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) hervorgerufen wurde. In diesem Zusammenhang könnte das in der vorliegenden Arbeit dargestellte Verfahren zur *in vivo* Langzeituntersuchung der fibrillären Tau-Aggregate eine Möglichkeit bieten, um die Kinetik des Zelluntergangs nach exzitotoxischen Schaden oder unter Einfluss vergleichbarer Stressfaktoren zu untersuchen. Eine weitere interessante Möglichkeit ergibt sich durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigte, permanente Bindung des Fluorophors FSB von mindestens 1 Monat an die fibrillären Tau-Aggregate. Hierdurch wird eine Methode denkbar, bei der die Zellen mit fibrillärem Tau *in vivo* durch FSB markiert werden und zeitlich versetzt *ex vivo* histologische Untersuchungen an denselben Zellen durchgeführt werden. Hierdurch wäre beispielsweise eine hochauflösende Analyse am konfokalen System von verschiedensten zellulären Faktoren in zeitlicher Abhängigkeit von der Bildung der fibrillären Tau-Aggregate möglich. Eine ähnliche „time-stamp“-Methode wurde bereits im Cortex transgener Mäuse für die Wachstumsanalyse von A β -Plaques und der assoziierten Neurotoxizität verwendet (Condello et al, 2011).

6.3 Übertragbarkeit der murinen Befunde auf ein humanes Diagnoseverfahren

In der bereits mehrfach diskutierten Studie von Koronyo-Hamaoui et al (2011) wurden neben A β -Plaques in den Retinae von DeltaE9-Tieren auch erstmals die Präsenz dieser Ablagerungen in postmortalen Retinae von Alzheimer-Patienten beschrieben. Die Autoren fanden die A β -Plaques nicht nur in den Retinae von Alzheimer-Patienten im fortgeschrittenen Stadium, sondern auch in Fällen, die im Frühstadium der Erkrankung verstorben waren. Die Studie schürte damit große Hoffnungen für ein mögliches Frühdiagnoseverfahren der Erkrankung über den Nachweis der A β -Plaques in der Retina.

In der vorliegenden Arbeit war es allerdings nicht möglich einen histologischen Nachweis von A β -Plaques im postmortalen Retinagewebe von Alzheimer-Patienten zu erbringen. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Koronyo-Hamaoui et al (2011) kann unterschiedliche Gründe haben. In erster Linie sind Unterschiede in der Prozessierung des Gewebes und den verwendeten Antikörperkonzentrationen (vgl. ausführlichere Darstellung in Kapitel 6.1) zu diskutieren. Deshalb lässt sich auch an diesem Punkt nicht vollkommen ausschließen, dass die Unterschiede zwischen den hier gezeigten Ergebnissen und den Befunden von Koronyo-Hamaoui et al (2011) auf methodischen Abweichungen beruhen. An diesem Punkt sollte jedoch nochmals darauf verwiesen werden, dass in der vorliegenden Arbeit standardisierte Verfahren aus der Routinediagnostik des Morbus Alzheimer eingesetzt wurden, und die Färbungen durchwegs an humanen Gehirnschnitten kontrolliert wurden. Unsere Negativbefunde werden zudem durch frühere Publikationen gestützt, in denen ebenfalls keine A β -Plaques in den Retinae von neuropathologisch diagnostizierten Fällen (Blanks et al, 1989; Hinton et al, 1986) bzw. Patienten mit klinischer Symptomatik (Leger et al, 2011) des Morbus Alzheimer gefunden wurden. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein Frühdiagnoseverfahren, das auf dem Nachweis von A β -Plaques in der humanen Retina basiert, nicht möglich ist.

Anders sieht es jedoch mit Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau aus. Diese fanden sich in den Retinae von Patienten mit sporadischem und familiärem Alzheimer, aber auch in Fällen von PSP, einer weiteren Tauopathie. Der hierbei verwendete Antikörper AT8 erkennt spezifisch Tau doppelt phosphoryliert an Ser202/Thr205 und findet weitverbreitet Anwendung in der histologischen Routinediagnostik des Morbus Alzheimer (Biernat et al, 1992; Braak et al, 2006). Weitere histologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen andere Phosphorylierungsstellen des Tau-Proteins (AT100: Ser212/214; AT180: Thr231/Thr235; AT270: Thr181; PHF-1: Ser396/404) resultierten hingegen in keinen positiven Färbungen der humanen Retinae. Diese offensichtlich schwierige Nachweisbarkeit

der Tau-Aggregate bietet einen möglichen Erklärungsansatz, weshalb bisherige Studien am postmortalen Retinagewebe von Alzheimer-Patienten keine Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau finden konnten (Blanks et al, 1989; Hinton et al, 1986; Leger et al, 2011; Löffler et al, 1995). Ein weiterer genereller Faktor, der einen histologischen Nachweis der retinalen Tau-Aggregate erschweren könnte, ist das Postmortalintervall (PI) der einzelnen Fälle. In der vorliegenden Arbeit zeigte nur einer von sechs der untersuchten Alzheimer-Patienten keine AT8-positiven Ablagerungen in der Retina. Hierbei handelte es sich um den Fall mit dem am weitesten fortgeschrittenen PI von ca. 72 h. In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass Faktoren wie das PI oder auch die Umgebungstemperatur einen erheblichen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad verschiedenster Proteine haben (Oka et al, 2011). Für das Tau-Protein wurde dieser Sachverhalt allerdings noch nicht endgültig gezeigt.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, inwiefern hyperphosphoryliertes Tau in der Retina für eine Alzheimer-Diagnose verwendet werden kann. Zunächst bleibt festzuhalten, dass hyperphosphoryliertes Tau keine für den Morbus Alzheimer spezifische pathologische Veränderung darstellt, sondern alle Tauopathien diese Veränderungen aufweisen (Goedert, 2004). Generell nimmt man jedoch an, dass hyperphosphoryliertes Tau als Biomarker für einen möglichen Diagnoseansatz des Morbus Alzheimer besser geeignet ist als A β -Plaques. Diese sind zwar typisch für die Alzheimer-Erkrankung, jedoch korrelieren extrazelluläre, fibrilläre A β -Ablagerungen im Gehirn nur unzureichend mit der klinischen Ausprägung der Demenz (Arriagada et al, 1992). Hingegen korreliert die Dichte und Verteilung versilberbarer, intrazellulärer Tau-Ablagerungen in Form von Tangles und Neuropilfäden im Gehirn wesentlich besser mit dem Schweregrad der Erkrankung (McKee et al, 1991).

Der präsentierte in vivo Nachweis von fibrillärem Tau in den Retinae von P301S-Mäusen verdeutlicht, wie ein diagnostisches System an Alzheimer-Patienten prinzipiell funktionieren könnte. Um zu überprüfen, ob der Ansatz einer Detektion von hyperphosphorylierten Tau-Aggregaten auch beim Menschen denkbar wäre, wurden die Retinae von AD- und PSP-Fällen mit verschiedenen Fluorophoren gefärbt. Die AT8-positiven Ablagerungen dieser Retinae konnten dabei allerdings weder mit den Fluorophoren FSB, BSc4090, Thioflavin-S noch durch eine Versilberung nach Gallyas gegengefärbt werden. Insbesondere die Färbung mit Thioflavin-S und die Versilberung nach Gallyas sind weitverbreitete Methoden, um histologisch zwischen fibrillären und nicht-fibrillären Tau-Aggregaten zu unterscheiden. Diese Färbungen beruhen dabei auf der charakteristischen β -Faltblattstruktur der Tau-Fibrillen (Kuret et al, 2005; Sun et al, 2002). Es ist davon auszugehen, dass auch Fluorophore wie FSB und BSc4090 abhängig von dieser β -Faltblattstruktur binden (Boländer et al, 2012; Sato

et al, 2004). Dies wiederum legt den Schluss nahe, dass es sich bei den AT8-positiven Tau-Ablagerungen in den Retinae der AD- und PSP-Patienten nicht um fibrilläre Aggregate handelt.

Basierend auf den aktuell verfügbaren fluoreszenten Markern gegen A β und Tau ist demnach ein Diagnoseverfahren des Morbus Alzheimer über einen Nachweis dieser Proteinaggregate in der Retina nicht denkbar.

6.4 Ausblick für ein Diagnoseverfahren des Morbus Alzheimer über die Retina

Um die beschriebenen AT8-positiven Anreicherungen in den humanen Alzheimer-Fällen als Biomarker für ein Retina-basiertes Diagnoseverfahren nutzen zu können, würde eine neue fluoreszente Sonde benötigt. Diese müsste hyperphosphoryliertes Tau auch in seiner nicht-fibrillären Konformation erkennen. Sollte in Zukunft ein solcher Ansatz weiterverfolgt werden, bleiben einige entscheidende Punkte zu klären. Für ein potentielles Frühdiagnoseverfahren wäre es zunächst essentiell zu wissen, ab welchem Zeitpunkt das hyperphosphorylierte Tau in der Retina relativ zur Pathologie im Gehirn detektiert werden kann. Auch müsste geklärt werden, ob die Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau in der Retina bei Alzheimer-Patienten von pathologischen Veränderungen bei Personen mit primären Augenerkrankungen abgrenzbar sind. So wurde beispielsweise bereits hyperphosphoryliertes Tau in den postmortalen Retinae von Glaukom-Patienten nachgewiesen (Gupta et al, 2008). Weiterhin könnten Patienten, die an anderen Tauopathien leiden, ebenfalls Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau in der Retina entwickeln, was eine diagnostische Abgrenzung vom Morbus Alzheimer erschwert oder sogar unmöglich macht. So ließen sich in der vorliegenden Studie in den Retinae von PSP-Patienten sehr intensive AT8-positive Ablagerungen im Vergleich zu den Alzheimer-Fällen feststellen.

Abgesehen von den Biomarkern A β und Tau wurden in der Vergangenheit auch andere Veränderungen in der Retina für ein Diagnoseverfahren des Morbus Alzheimer in Betracht gezogen. Beispielsweise wurden Verminderungen der RNFL-Dicke in OCT-Messungen (Iseri et al, 2006; Lu et al, 2010; Paquet et al, 2007) oder Veränderungen im Elektretinogramm (ERG) von Alzheimer-Patienten beschrieben (Krasodomska et al, 2010). Beide Befunde wurden bei Patienten im Frühstadium der Erkrankung beschrieben, weshalb ihre Relevanz für eine mögliche Frühdiagnose diskutiert wurde. Es ist anzunehmen, dass die Veränderungen im OCT und dem ERG in der beschriebenen Ganglienzelldegeneration von Alzheimer-Patienten begründet liegen (Blanks et al, 1989; Hinton et al, 1986). Eine direkte

Untersuchung der Degeneration von Ganglienzellen wäre durch eine intravitreale Injektion von Apoptosemarkern wie Annexin-V in vivo denkbar. Eine solche Untersuchungsmethode wurde bereits erfolgreich an der Mausretina durchgeführt (Cordeiro et al, 2010; Cordeiro et al, 2004; Guo et al, 2007). Weiterhin wurden bei Patienten des Morbus Alzheimer verengte Venen und ein verminderter Blutfluss in der Retina festgestellt (Berisha et al, 2007). Auch anderen Bereichen des Auges wurde eine potentielle diagnostische Verwertbarkeit zugeschrieben. So wurden in der Linse und im Kammerwasser von Alzheimer-Patienten A β in Konzentrationen festgestellt, die mit dem Gehirn bzw. CSF vergleichbar waren (Goldstein et al, 2003). Zudem zeigten die Betroffenen eine Hypersensitivität gegen Augentropfen mit dem Wirkstoff Tropicamid, einem cholinergen Antagonisten (Scinto et al, 1994). Für all diese Befunde bleibt jedoch abzuklären, inwiefern sie von ausreichender Spezifität sind. Abgesehen von den potentiellen Frühdiagnoseverfahren über das Auge ist davon auszugehen, dass in naher Zukunft Methoden, wie das MRT- und PET-Imaging oder die biochemischen Untersuchungen am Liquor von AD-Patienten, weiter vorangetrieben werden (Hansson et al, 2006; Klunk et al, 2004; Mattsson et al, 2009b; Nordberg, 2004). So wurde vor kurzem eine Langzeitstudie veröffentlicht, die die Detektion einzelner Biomarker vor dem Einsetzen erster klinischer Symptome bei FAD-Patienten beschreibt (Bateman et al, 2012). Beispielsweise wurden 25 Jahre vor dem erwarteten Einsetzen erster Symptome der FAD-Patienten ein verminderter Spiegel von A β_{42} im CSF nachgewiesen. 15 Jahre vor den ersten Symptomen wurden außerdem ein erhöhter Spiegel von hyperphosphoryliertem Tau im CSF, eine verstärkte Gehirnatrophie im MRT und A β -Plaques durch PET-Imaging festgestellt. Diese Diagnoseverfahren haben jedoch mit generellen Nachteilen wie z.B. hohen Kosten oder der Invasivität zu kämpfen. Hierdurch vermindern sich die Aussichten auf ein breit einsetzbares Frühdiagnoseverfahren. Weiterhin bleibt abzuwarten, inwiefern die erzielten Ergebnisse mit FAD-Patienten aus der Studie von Bateman et al (2012) auch bei sporadischen Fällen der Erkrankung wiederholt werden können (Mucke, 2009).

7 Literatur

- 1 Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* **22**(21): 9340-9351
- 2 Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J (1999) Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* **453**(3): 260-264
- 3 Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **64**: 146-148
- 4 Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK (1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* **128**(1): 126-128
- 5 Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**(3 Pt 1): 631-639
- 6 Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011) Alzheimer's disease. *Lancet* **377**(9770): 1019-1031
- 7 Barber RC (2010) Biomarkers for early detection of Alzheimer disease. *J Am Osteopath Assoc* **110**(9 Suppl 8): S10-15
- 8 Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC (2012) Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **367**(9): 795-804
- 9 Berisha F, Fekete GT, Trempe CL, McMeel JW, Schepens CL (2007) Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(5): 2285-2289

- 10 Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M, Crowther RA (2003) Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 9034-9038
- 11 Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, et al. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J* **11**(4): 1593-1597
- 12 Bindewald A, Jorzik JJ, Roth F, Holz FG (2005) [cSLO digital fundus autofluorescence imaging]. *Ophthalmologie* **102**(3): 259-264
- 13 Bittner T, Burgold S, Dorostkar MM, Fuhrmann M, Wegenast-Braun BM, Schmidt B, Kretzschmar H, Herms J (2012) Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathol*
- 14 Blanks JC, Hinton DR, Sadun AA, Miller CA (1989) Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res* **501**(2): 364-372
- 15 Boländer A, Kieser D, Voss C, Bauer S, Schön C, Burgold S, Bittner T, Holzer J, Heyny-von Haussen R, Mall G, Goetschy V, Czech C, Knust H, Berger R, Herms J, Hilger I, Schmidt B (2012) Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines, and -pyridazines As Imaging Agents for Tau Fibrils and beta-Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Models. *J Med Chem*
- 16 Bong P (2000) Spectral and Photophysical Behaviors of Curcumin and Curcuminoids. *Bull Korean Chem Soc* **21**(1): 81-86
- 17 Borson S, Raskind MA (1997) Clinical features and pharmacologic treatment of behavioral symptoms of Alzheimer's disease. *Neurology* **48**(5 Suppl 6): S17-24
- 18 Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretzschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* **112**(4): 389-404
- 19 Bull ND, Guidi A, Goedert M, Martin KR, Spillantini MG (2012) Reduced axonal transport and increased excitotoxic retinal ganglion cell degeneration in mice transgenic for human mutant P301S tau. *PLoS One* **7**(4): e34724

- 20 Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* **267**(1): 546-554
- 21 Burgold S, Bittner T, Dorostkar MM, Kieser D, Fuhrmann M, Mitteregger G, Kretzschmar H, Schmidt B, Herms J (2010) In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. *Acta Neuropathol* **121**(3): 327-335
- 22 Burns A (2009) Alzheimer's disease: on the verges of treatment and prevention. *Lancet Neurol* **8**(1): 4-5
- 23 Busciglio J, Lorenzo A, Yeh J, Yankner BA (1995) beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* **14**(4): 879-888
- 24 Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM (2007) Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am J Pathol* **170**(5): 1669-1675
- 25 Condello C, Schain A, Grutzendler J (2011) Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition. *Sci Rep* **1**: 19
- 26 Cordeiro MF, Guo L, Coxon KM, Duggan J, Nizari S, Normando EM, Sensi SL, Sillito AM, Fitzke FW, Salt TE, Moss SE (2010) Imaging multiple phases of neurodegeneration: a novel approach to assessing cell death in vivo. *Cell Death Dis* **1**: e3
- 27 Cordeiro MF, Guo L, Luong V, Harding G, Wang W, Jones HE, Moss SE, Sillito AM, Fitzke FW (2004) Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13352-13356
- 28 Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**(5123): 921-923
- 29 de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spires-Jones TL, Hyman BT (2010) Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* **464**(7292): 1201-1204
- 30 Dowling JE, Boycott BB (1966) Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **166**(2): 80-111

- 31 Dutescu RM, Li QX, Crowston J, Masters CL, Baird PN, Culvenor JG (2009) Amyloid precursor protein processing and retinal pathology in mouse models of Alzheimer's disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**(9): 1213-1221
- 32 Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* **115**(1): 5-38
- 33 Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**(1): 41-51
- 34 Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* **366**(9503): 2112-2117
- 35 Fischer MD, Huber G, Beck SC, Tanimoto N, Muehlfriedel R, Fahl E, Grimm C, Wenzel A, Reme CE, van de Pavert SA, Wijnholds J, Pacal M, Bremner R, Seeliger MW (2009) Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography. *PLoS One* **4**(10): e7507
- 36 Fox NC, Freeborough PA, Rossor MN (1996) Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer's disease. *Lancet* **348**(9020): 94-97
- 37 Fujimoto JG (2003) Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging. *Nat Biotechnol* **21**(11): 1361-1367
- 38 Gasparini L, Crowther RA, Martin KR, Berg N, Coleman M, Goedert M, Spillantini MG (2011) Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: effects on axonal viability. *Neurobiol Aging* **32**(3): 419-433
- 39 Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**(3): 885-890
- 40 Goedert M (2004) Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* **15**(1): 45-49
- 41 Goedert M, Jakes R (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**(2-3): 240-250

- 42 Goldstein LE, Muffat JA, Cherny RA, Moir RD, Ericsson MH, Huang X, Mavros C, Coccia JA, Faget KY, Fitch KA, Masters CL, Tanzi RE, Chylack LT, Jr., Bush AI (2003) Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet* **361**(9365): 1258-1265
- 43 Götz J, Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* **9**(7): 532-544
- 44 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**(13): 6084-6089
- 45 Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(13): 4913-4917
- 46 Guo L, Duggan J, Cordeiro MF (2010) Alzheimer's disease and retinal neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res* **7**(1): 3-14
- 47 Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, Ferrari G, Russo-Marie F, Sillito AM, Cheetham ME, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF (2007) Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(33): 13444-13449
- 48 Gupta N, Fong J, Ang LC, Yucel YH (2008) Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol* **43**(1): 53-60
- 49 Haass C (2010) Initiation and propagation of neurodegeneration. *Nat Med* **16**(11): 1201-1204
- 50 Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* **268**(5): 3021-3024
- 51 Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(5): a006270
- 52 Hampton DW, Webber DJ, Bilican B, Goedert M, Spillantini MG, Chandran S (2010) Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy. *J Neurosci* **30**(30): 9973-9983

- 53 Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* **147**(1): 58-62
- 54 Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L (2006) Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol* **5**(3): 228-234
- 55 Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**(5580): 353-356
- 56 Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M (1998) Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* **437**(3): 207-210
- 57 Hassenstein A, Meyer CH (2009) Clinical use and research applications of Heidelberg retinal angiography and spectral-domain optical coherence tomography - a review. *Clin Experiment Ophthalmol* **37**(1): 130-143
- 58 Helb HM, Charbel Issa P, Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Scholl HP, Meyer CH, Eter N, Holz FG (2010a) Clinical evaluation of simultaneous confocal scanning laser ophthalmoscopy imaging combined with high-resolution, spectral-domain optical coherence tomography. *Acta Ophthalmol* **88**(8): 842-849
- 59 Helb HM, Stanzel BV, Eter N (2010b) Erhebung und Auswertung von OCT-Befunden bei Makulaerkrankungen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* **227**: R107 - R127
- 60 Herculano-Houzel S (2009) The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* **3**: 31
- 61 Hernandez F, Gomez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J (2009) GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol* **223**(2): 322-325
- 62 Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Sato K, Sasamoto K, Saido TC (2005) 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neurosci* **8**(4): 527-533
- 63 Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA (1986) Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **315**(8): 485-487

- 64 Hof PR, Morrison JH (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: II. Primary and secondary visual cortex. *J Comp Neurol* **301**(1): 55-64
- 65 Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee VM (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* **282**(5395): 1914-1917
- 66 Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**(5284): 99-102
- 67 Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, et al. (1991) Optical coherence tomography. *Science* **254**(5035): 1178-1181
- 68 Huber G, Beck SC, Grimm C, Sahaboglu-Tekgoz A, Paquet-Durand F, Wenzel A, Humphries P, Redmond TM, Seeliger MW, Fischer MD (2009) Spectral domain optical coherence tomography in mouse models of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(12): 5888-5895
- 69 Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* **1739**(2-3): 198-210
- 70 Iseri PK, Altinas O, Tokay T, Yuksel N (2006) Relationship between cognitive impairment and retinal morphological and visual functional abnormalities in Alzheimer disease. *J Neuroophthalmol* **26**(1): 18-24
- 71 Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K (1993) Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* **325**(3): 167-172
- 72 Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010) Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* **9**(1): 119-128
- 73 Jackson GR, Owsley C (2003) Visual dysfunction, neurodegenerative diseases, and aging. *Neurol Clin* **21**(3): 709-728

- 74 Jacobs GH, Neitz J, Deegan JF, 2nd (1991) Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature* **353**(6345): 655-656
- 75 Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* **13**(2): 159-170
- 76 Jellinger KA (2006) Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly--an update. *J Alzheimers Dis* **9**(3 Suppl): 61-70
- 77 Johnson LV, Leitner WP, Rivest AJ, Staples MK, Radeke MJ, Anderson DH (2002) The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11830-11835
- 78 Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**(6106): 733-736
- 79 Katz B, Rimmer S (1989) Ophthalmologic manifestations of Alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol* **34**(1): 31-43
- 80 Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* **197**: 192-193
- 81 Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Debnath ML, Holt DP, Wang Y, Hyman BT (2002) Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**(9): 797-805
- 82 Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* **55**(3): 306-319
- 83 Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov AV, Miller CA, Ko MK, Black KL, Schwartz M, Farkas DL (2011) Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and

- noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *Neuroimage* **54 Suppl 1**: 204-217
- 84 Koronyo Y, Salumbides BC, Black KL, Koronyo-Hamaoui M (2012) Alzheimer's disease in the retina: imaging retinal abeta plaques for early diagnosis and therapy assessment. *Neurodegener Dis* **10**(1-4): 285-293
- 85 Krasodomska K, Lubinski W, Potemkowski A, Honczarenko K (2010) Pattern electroretinogram (PERG) and pattern visual evoked potential (PVEP) in the early stages of Alzheimer's disease. *Doc Ophthalmol* **121**(2): 111-121
- 86 Kuret J, Congdon EE, Li G, Yin H, Yu X, Zhong Q (2005) Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microsc Res Tech* **67**(3-4): 141-155
- 87 Leger F, Fernagut PO, Canron MH, Leoni S, Vital C, Tison F, Bezard E, Vital A (2011) Protein aggregation in the aging retina. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**(1): 63-68
- 88 Lehman EJ, Kulnane LS, Lamb BT (2003) Alterations in beta-amyloid production and deposition in brain regions of two transgenic models. *Neurobiol Aging* **24**(5): 645-653
- 89 Lerman S (1987) Chemical and physical properties of the normal and aging lens: spectroscopic (UV, fluorescence, phosphorescence, and NMR) analyses. *Am J Optom Physiol Opt* **64**(1): 11-22
- 90 Leung CK, Weinreb RN, Li ZW, Liu S, Lindsey JD, Choi N, Liu L, Cheung CY, Ye C, Qiu K, Chen LJ, Yung WH, Crowston JG, Pu M, So KF, Pang CP, Lam DS (2011) Long-term in vivo imaging and measurement of dendritic shrinkage of retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(3): 1539-1547
- 91 Lewis DA, Campbell MJ, Terry RD, Morrison JH (1987) Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J Neurosci* **7**(6): 1799-1808
- 92 Liu B, Rasool S, Yang Z, Glabe CG, Schreiber SS, Ge J, Tan Z (2009) Amyloid-peptide vaccinations reduce {beta}-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *Am J Pathol* **175**(5): 2099-2110
- 93 Löffler KU, Edward DP, Tso MO (1995) Immunoreactivity against tau, amyloid precursor protein, and beta-amyloid in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(1): 24-31

- 94 Lu Y, Li Z, Zhang X, Ming B, Jia J, Wang R, Ma D (2010) Retinal nerve fiber layer structure abnormalities in early Alzheimer's disease: evidence in optical coherence tomography. *Neurosci Lett* **480**(1): 69-72
- 95 Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* **20**(1-2): 27-39
- 96 Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST (2008) Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **283**(14): 9359-9368
- 97 Magnani E, Fan J, Gasparini L, Golding M, Williams M, Schiavo G, Goedert M, Amos LA, Spillantini MG (2007) Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J* **26**(21): 4546-4554
- 98 Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 4245-4249
- 99 Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H (2009a) CSF biomarkers: pinpointing Alzheimer pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1180**: 28-35
- 100 Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M, Rich K, Kaiser E, Verbeek M, Tsolaki M, Mulugeta E, Rosen E, Aarsland D, Visser PJ, Schroder J, Marcusson J, de Leon M, Hampel H, Scheltens P, Pirttila T, Wallin A, Jonhagen ME, Minthon L, Winblad B, Blennow K (2009b) CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* **302**(4): 385-393
- 101 Maurice CA, Ruchoux MM, de Vos R, Surguchov A, Destee A (2003) Retinal involvement in dementia with Lewy bodies: a clue to hallucinations? *Ann Neurol* **54**(4): 542-547
- 102 McKee AC, Kosik KS, Kowall NW (1991) Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **30**(2): 156-165

- 103 Melov S, Wolf N, Strozyk D, Doctrow SR, Bush AI (2005) Mice transgenic for Alzheimer disease beta-amyloid develop lens cataracts that are rescued by antioxidant treatment. *Free Radic Biol Med* **38**(2): 258-261
- 104 Mendez MF, Shapira JS, McMurtray A, Licht E (2007) Preliminary findings: behavioral worsening on donepezil in patients with frontotemporal dementia. *Am J Geriatr Psychiatry* **15**(1): 84-87
- 105 Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* **41**(4): 479-486
- 106 Morrison JH, Hof PR (1997) Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278**(5337): 412-419
- 107 Moyes CD, Schulte MP (2007) Tierphysiologie. *Pearson Studium Verlag, München*
- 108 Mucke L (2009) Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature* **461**(7266): 895-897
- 109 Nakashima H, Ishihara T, Suguimoto P, Yokota O, Oshima E, Kugo A, Terada S, Hamamura T, Trojanowski JQ, Lee VM, Kuroda S (2005) Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol* **110**(6): 547-556
- 110 NIA (1997) Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* **18**(4 Suppl): S1-2
- 111 Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J (2008) Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(11): 5136-5143
- 112 Nordberg A (2004) PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **3**(9): 519-527
- 113 O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **34**: 185-204

- 114 Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **24**(8): 1063-1070
- 115 Ohno-Matsui K (2011) Parallel findings in age-related macular degeneration and Alzheimer's disease. *Prog Retin Eye Res* **30**(4): 217-238
- 116 Oka T, Tagawa K, Ito H, Okazawa H (2011) Dynamic changes of the phosphoproteome in postmortem mouse brains. *PLoS One* **6**(6): e21405
- 117 Olson MI, Shaw CM (1969) Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain* **92**(1): 147-156
- 118 Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**(5280): 1392-1395
- 119 Otvos L, Jr., Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* **39**(6): 669-673
- 120 Paquet C, Boissonnot M, Roger F, Dighiero P, Gil R, Hugon J (2007) Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **420**(2): 97-99
- 121 Peichl L (1992) Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina der Säugetiere. *Biologie in unserer Zeit* **22**(1): 45-53
- 122 Perez M, Ribe E, Rubio A, Lim F, Moran MA, Ramos PG, Ferrer I, Isla MT, Avila J (2005) Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience* **130**(2): 339-347
- 123 Perez SE, Lumayag S, Kovacs B, Mufson EJ, Xu S (2009) Beta-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(2): 793-800
- 124 Plassman BL, Langa KM, Fisher GG, Heeringa SG, Weir DR, Ofstedal MB, Burke JR, Hurd MD, Potter GG, Rodgers WL, Steffens DC, Willis RJ, Wallace RB (2007) Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study. *Neuroepidemiology* **29**(1-2): 125-132

- 125 Prince M, Bryce R, Ferri C (2011) World Alzheimer Report 2011 - The benefits of early diagnosis and intervention. *Alzheimer's Disease International*(London)
- 126 Prince M, Jackson J (2009) World Alzheimer Report 2009 *Alzheimer's Disease International*(London)
- 127 Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jaggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Holscher C, Mathews PM, Jucker M (2006) A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* **7**(9): 940-946
- 128 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491
- 129 Samuels SC, Davis KL (1998) Experimental approaches to cognitive disturbance in Alzheimer's disease. *Harv Rev Psychiatry* **6**(1): 11-22
- 130 Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1994) Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem* **269**(2): 1510-1517
- 131 Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **309**(5733): 476-481
- 132 Sato K, Higuchi M, Iwata N, Saido TC, Sasamoto K (2004) Fluoro-substituted and ¹³C-labeled styrylbenzene derivatives for detecting brain amyloid plaques. *Eur J Med Chem* **39**(7): 573-578
- 133 Scinto LF, Daffner KR, Dressler D, Ransil BI, Rentz D, Weintraub S, Mesulam M, Potter H (1994) A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science* **266**(5187): 1051-1054
- 134 Seeliger MW, Beck SC, Pereyra-Munoz N, Dangel S, Tsai JY, Luhmann UF, van de Pavert SA, Wijnholds J, Samardzija M, Wenzel A, Zrenner E, Narfstrom K, Fahl E, Tanimoto N, Acar N, Tonagel F (2005) In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. *Vision Res* **45**(28): 3512-3519

- 135 Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**(2): 741-766
- 136 Sereno L, Coma M, Rodriguez M, Sanchez-Ferrer P, Sanchez MB, Gich I, Agullo JM, Perez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimon J, Lleó A, Gomez-Isla T (2009) A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis* **35**(3): 359-367
- 137 Shimada K, Motoi Y, Ishiguro K, Kambe T, Matsumoto SE, Itaya M, Kunichika M, Mori H, Shinohara A, Chiba M, Mizuno Y, Ueno T, Hattori N (2012) Long-term oral lithium treatment attenuates motor disturbance in tauopathy model mice: implications of autophagy promotion. *Neurobiol Dis* **46**(1): 101-108
- 138 Spires-Jones TL, Kopeikina KJ, Koffie RM, de Calignon A, Hyman BT (2011) Are tangles as toxic as they look? *J Mol Neurosci* **45**(3): 438-444
- 139 Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, Hyman BT (2009) Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci* **32**(3): 150-159
- 140 Stryer L (1986) Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* **9**: 87-119
- 141 Sun A, Nguyen XV, Bing G (2002) Comparative analysis of an improved thioflavin-s stain, Gallyas silver stain, and immunohistochemistry for neurofibrillary tangle demonstration on the same sections. *J Histochem Cytochem* **50**(4): 463-472
- 142 Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* **273**(3): 729-739
- 143 Surguchov A, McMahan B, Masliah E, Surgucheva I (2001) Synucleins in ocular tissues. *J Neurosci Res* **65**(1): 68-77
- 144 Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* **282**(46): 33305-33312
- 145 Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**(5440): 735-741

- 146 Velasco A, Fraser G, Delobel P, Ghetti B, Lavenir I, Goedert M (2008) Detection of filamentous tau inclusions by the fluorescent Congo red derivative FSB [(trans,trans)-1-fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene]. *FEBS Lett* **582**(6): 901-906
- 147 von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2001) Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. *J Biol Chem* **276**(51): 48165-48174
- 148 Walsh MK, Quigley HA (2008) In vivo time-lapse fluorescence imaging of individual retinal ganglion cells in mice. *J Neurosci Methods* **169**(1): 214-221
- 149 Wässle H (2004) Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 747-757
- 150 Wässle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* **71**(2): 447-480
- 151 Webb RH, Hughes GW, Delori FC (1987) Confocal scanning laser ophthalmoscope. *Appl Opt* **26**(8): 1492-1499
- 152 Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**(1): 115-126
- 153 Wimo A, Prince M (2010) World Alzheimer Report 2010 - The global economic impact of dementia. *Alzheimer's Disease International*(London)
- 154 Wolf-Schnurbusch UE, Ceklic L, Brinkmann CK, Iliev ME, Frey M, Rothenbuehler SP, Enzmann V, Wolf S (2009) Macular thickness measurements in healthy eyes using six different optical coherence tomography instruments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(7): 3432-3437
- 155 Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* **398**(6727): 513-517
- 156 Xu H, Chen M, Manivannan A, Lois N, Forrester JV (2008) Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* **7**(1): 58-68

-
- 157 Yoneda S, Hara H, Hirata A, Fukushima M, Inomata Y, Tanihara H (2005) Vitreous fluid levels of beta-amyloid((1-42)) and tau in patients with retinal diseases. *Jpn J Ophthalmol* **49**(2): 106-108
- 158 Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* **120 Suppl 1**: 9-21
- 159 Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK (2011) The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr* **5**(4): 280-292

8 Anhang

8.1 Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Jochen Herms für die Bereitstellung des hochaktuellen Themas, die Betreuung und das Vertrauen.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss für Ihre Zeit und Mühe bei der Begutachtung der Doktorarbeit und der Vertretung an der biologischen Fakultät.

Herrn Prof. Dr. George Boyan möchte ich für seine Zeit und Mühe bei der Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Personen aus dem Verbundprojekt MINDE für die erfolgreiche und interessante Zusammenarbeit. Ein spezieller Dank gilt hierbei Prof. Dr. Boris Schmidt, Dr. Daniel Kieser und Dr. Alexander Boländer für die Bereitstellung der Fluorophore und das beständig offene Ohr sowie Dr. Michael Kempe, Dr. Johannes-Michael Ostermann und Prof. Dr. Seeliger für die Hilfe zur Etablierung der in vivo Mausuntersuchungen.

Ein besonderer Dank gebührt allen Mitarbeitern des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, insbesondere allen aktiven und ausgeschiedenen Mitgliedern der AG Herms. Vielen Dank für die produktive Zusammenarbeit, das Interesse an meiner Arbeit und die teilweise hitzigen Diskussionen in- und außerhalb des Instituts.

Meiner Familie herzlichen Dank, für ihren beständigen Rückhalt, die Förderung meines Lebenswegs und einen stets sicheren Hafen.

Ein besonderer Dank geht an Sonja, für ihre beständige Unterstützung in allen Bereichen und Ihre Liebe.