
**Charakterisierung der in vivo
Wachstumskinetik amyloider Plaques und
der synaptischen Pathologie mit Evaluierung
eines immuntherapeutischen Ansatzes in
einem Alzheimer-Mausmodell**

Steffen Burgold



München 2013

**Charakterisierung der in vivo
Wachstumskinetik amyloider Plaques und
der synaptischen Pathologie mit Evaluierung
eines immuntherapeutischen Ansatzes in
einem Alzheimer-Mausmodell**

Steffen Burgold

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Steffen Burgold
aus Jena

München, den 29. Mai 2013

Diese Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Jochen Herms am Lehrstuhl für Translationale Hirnforschung der Ludwig-Maximilians-Universität angefertigt und von Prof. Dr. Rainer Uhl an der Fakultät für Biologie vertreten.

Eidesstattliche Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den 29. Mai 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer Uhl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alexander Borst

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Oktober 2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Alzheimer	2
1.1.1 Historie und epidemiologische Aspekte	2
1.1.2 Klinische Symptome	2
1.1.3 Neuropathologische Merkmale	4
1.1.4 Genetische und andere Risikofaktoren	7
1.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein APP	8
1.2.1 Struktur, Lokalisation und Prozessierung von APP	8
1.2.2 Funktionen von APP und dessen proteolytische Fragmente	10
1.2.3 Aggregation des A β -Peptids	11
1.3 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	12
1.4 Die Immunisierung als therapeutische Strategie bei Morbus Alzheimer	16
1.5 Intravitaluntersuchungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie	18
1.6 Strukturelle Plastizität dendritischer Spines	23
2 Ergebnisse	27
2.1 In vivo Analyse der Dichte dendritischer Spines	28
2.1.1 Einführung der verwendeten Mausmodelle	28
2.1.2 Statische Untersuchung der Dichte dendritischer Spines	30
2.1.3 Kinetische Analyse dendritischer Spines	31
2.1.4 Morphologie dendritischer Spines	33
2.2 In vivo Wachstumskinetik amyloider Plaques	34
2.2.1 Nachweis eines longitudinalen und stetigen Wachstums amyloider Plaques über mehrere Wochen	35
2.2.2 Untersuchung einer möglichen Immunreaktion unter dem kranialen Fenster	37
2.2.3 Eine detaillierte Darstellung von Plaquedichte, Plauegröße und Plauewachstum	39
2.2.4 In vivo Wachstum amyloider Plaques in einem Zeitraum von 15 Monaten	43
2.2.5 Zusammenhänge zwischen den kinetischen Parametern des Plauewachstums	49
2.3 Therapieeffekte einer passiven Immunisierung gegen A β -Oligomere	51
2.3.1 Einfluss einer passiven Immuntherapie auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques in vivo	52
2.3.2 Etablierung der Synapsenfärbung und -auswertung	55

2.3.3	Ergebnisse zur Messung der Synapsendichten	58
2.3.4	Lokalisation verschiedener A β -Aggregate in vivo	64
3	Diskussion	67
3.1	Effekt der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins auf die Spinedichte in vivo	68
3.1.1	Schicht II/III Neurone zeigen keine Unterschiede in der Spinedichte	69
3.1.2	Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins führt zu einer erhöhten Spinedichte in Schicht V Neuronen	70
3.1.3	Zusammenfassung	73
3.2	In vivo Wachstumskinetik amyloider Plaques	74
3.2.1	Der erste Nachweis eines stetigen Plaquewachstums	74
3.2.2	Charakterisierung der Immunreaktion unter dem kranialen Fenster	75
3.2.3	Die Immunreaktion beeinflusst das Plaquewachstum	77
3.2.4	Eine detaillierte Beschreibung der in vivo Plaquewachstumskinetik	79
3.2.5	Die verschiedenen Phasen des Wachstums amyloider Plaques	83
3.2.6	Zusammenfassung	88
3.3	Therapieeffekte einer passiven Immunisierung gegen A β -Oligomere	91
3.3.1	Einfluss auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques	91
3.3.2	Etablierung der Synapsenfärbung und -auswertung	93
3.3.3	Reduktion der Dichte von Postsynapsen durch die Überproduktion des Amyloid-Vorläuferproteins	95
3.3.4	Wirkung amyloider Plaques auf die Synapsendichte	98
3.3.5	Lokalisation verschiedener A β -Aggregate in vivo	101
3.3.6	Zusammenfassung	103
4	Material und Methoden	105
4.1	Transgene Mäuse und deren Genotypisierung	106
4.1.1	Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsien	106
4.1.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	106
4.1.3	YFP-H	106
4.1.4	Tg2576	107
4.1.5	CX ₃ CR1-GFP	108
4.1.6	Auftrennung der DNS-Fragmente mittels Gelelektrophorese	109
4.1.7	Maushaltung	110
4.2	Intravitalmikroskopie	111
4.2.1	Implantation eines kranialen Fensters	111
4.2.2	Zwei-Photonen-Mikroskopie	112
4.2.3	Durchführung des Therapieversuchs	116
4.2.4	In vivo Färbung verschiedener A β -Aggregate	116
4.3	Immunhistochemie	118

4.3.1	Transkardiale Perfusion	118
4.3.2	Schneiden und immunhistochemisches Färben von Mausgehirnen	118
4.3.3	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	120
4.4	Datenauswertung und Bildanalysen	121
4.4.1	Quantitative Auswertung dendritischer Spines	121
4.4.2	Quantitative Auswertung von Mikroglia und Astrozyten	122
4.4.3	Kinetik des Volumens amyloider Plaques	123
4.4.4	Detektion von Synapsen	124
4.4.5	Statistik und Datenauswertung	128
4.5	Material und Lösungen	129
	Literatur	133
	Abkürzungen	173
	Eigene Veröffentlichungen	176
	Danksagung	179

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die histopathologischen Merkmale der ersten Alzheimer-Patientin Auguste Deter	3
1.2	Die sequentielle Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins APP	9
1.3	Die in vitro Aggregationskinetik des A β -Peptids	12
1.4	Ablauf der pathologischen Vorgänge beim Morbus Alzheimer nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese	15
1.5	Beschreibung der Fluoreszenzanregung durch ein oder zwei Photonen	19
1.6	Prinzipieller Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskopes und die Generation dreidimensionaler Bilder	21
1.7	Beispiel eines dreidimensionalen Bildes amyloider Plaques mit einem Angiogramm	22
2.1	Einführung der verwendeten Mausmodelle	29
2.2	Vergleich der Spinedichten unter dem Einfluss der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins	31
2.3	In vivo Zeitserie apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen	32
2.4	Kinetische Analyse der dendritischen Spines von Schicht V Neuronen	33
2.5	Morphologie dendritischer Spines von Schicht V Neuronen	34
2.6	In vivo Zeitserien amyloider Plaques	35
2.7	Nachweis eines longitudinalen Plaquewachstums	36
2.8	Gliaaktivierung nach Implantation eines kranialen Fensters	38
2.9	Altersgruppen zur detaillierten Untersuchung des Plaquewachstums	40
2.10	Ergebnisse aus der Untersuchung des Plaquewachstums	42
2.11	Beispiel der Plaquewachstumskinetik über 15,5 Monate	44
2.12	Beispiel der Kinetik eines Plaques über 15,5 Monate	45
2.13	Differenzierte Analyse der Plaquewachstumsgeschwindigkeit im Langzeitversuch	46
2.14	Untersuchung des Plaquewachstums im Alter von zwölf bis 18 Monaten	47
2.15	Korrelationen zur Entstehungs- und Wachstumskinetik von Plaques	49
2.16	Ortsaufgelöste Darstellung der Plaquewachstumsgeschwindigkeit . .	50
2.17	Wirkprinzip des Therapieversuches	52
2.18	Plaquewachstum und passive Immunisierung	54
2.19	Übersicht der Synapsenfärbungen	56
2.20	Methode zur Auswertung der Synapsendaten	57
2.21	Analyse der Synapsendichten abseits vom Plaque	59
2.22	Analyse der Synapsendichten in der Umgebung von Plaques	61
2.23	Therapieeffekte auf die Synapsendichten in der Umgebung von Plaques	63
2.24	In vivo Markierung verschiedener A β -Aggregate	65

3.1	Zusammenfassung der verschiedenen Phasen des Plaquewachstums .	89
4.1	Darstellung der Bandenmuster zur Genotypisierung der Mauslinien	110
4.2	Darstellung der Positionierung zum wiederholten Mikroskopieren einer Gehirnregion in einer lebenden Maus	114
4.3	Darstellung der Anregungs- und Emissionsspektren von Methoxy-X04 und Alex594	117
4.4	Darstellung der dreidimensionalen Auswertung amyloider Plaques über die Zeit	124
4.5	Beispiel zur Bildoptimierung mittels Dekonvolution	125
4.6	Darstellung der Synapsendetektion mittels Laplace-Operator	126
4.7	Messung der Synapsendichte in Abhängigkeit zur Entfernung von amyloiden Plaques	127

Tabellenverzeichnis

4.1	Primer, PCR-Ansatz und -Programm für die Thy-1-YFP Genotypisierung	107
4.2	Primer, PCR-Ansatz und -Programm für die Tg2576 Genotypisierung	108
4.3	Primer, PCR-Ansatz und -Programm für die CX ₃ CR1-GFP Genotypisierung	109
4.4	Material und Lösungen	129

Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist die häufigste Form einer Demenzerkrankung und stellt aufgrund der steigenden Lebenserwartung eine sehr große ökonomische und emotionale Belastung für Patienten, deren Familien und die gesamte Gesellschaft dar. Eine Verringerung dieser Belastung erfordert dringend krankheitsmodifizierende Therapien, die bisher nicht zur Verfügung stehen. Als wahrscheinlichste Erklärung für die molekularen Ursachen der Krankheit wurde in der Amyloid-Kaskaden-Hypothese postuliert, dass die Akkumulation und Aggregation des A β -Peptids das zentrale Ereignis darstellt. Infolgedessen kommt es zu synaptischen Beeinträchtigungen durch A β -Oligomere, Entzündungsreaktionen durch unlösliche A β -Aggregate in Form von amyloiden Plaques, progressiven Schädigungen von Synapsen und Neuronen, oxidativem Stress, der Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau und einem Neuronenverlust. Das A β -Peptid wird durch sequentielle Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) durch die β - und γ -Sekretase konstitutiv im Gehirn produziert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Überexpression eines humanen APP mit der schwedischen Mutation auf Synapsen und die Akkumulationskinetik des A β -Peptids zu amyloiden Plaques in einem Alzheimer-Mausmodell (Tg2576) untersucht. Die detaillierte Charakterisierung des Mausmodells wurde in einer Therapiestudie umgesetzt, in der eine passive Immunisierung gegen das A β -Peptid oder A β -Oligomere getestet wurde.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Überexpression des APP auf dendritische Spines untersucht, die das postsynaptische Kompartiment glutamaterger Synapsen entlang von Dendriten bilden. Als Reporter-Tiere wurden Mäuse verwendet, die das gelbfluoreszierende Protein YFP in einem Teil der pyramidalen Neuronen des Cortex exprimieren. Mithilfe der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden die dendritischen Spines an den apikalen Dendriten der Schicht II/III und V Neurone im somatosensorischen Cortex analysiert. Die Überexpression des APP führte zu einem differentiellen Effekt, wobei in Schicht II/III Neuronen keine Änderung und in Schicht V Neuronen eine Erhöhung der Dichte dendritischer Spines gemessen wurde. Eine detaillierte Charakterisierung zeigte eine Mehrzahl an stabilen Spines als ursächlich für die erhöhte Spinedichte, während keine zeitliche Änderung der Spinedichte über sechs Wochen detektiert wurde. Auch die Morphologie der dendritischen

Spines war unverändert. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche physiologische Rolle von APP und/oder dessen proteolytische Fragmente an Synapsen.

Ein wichtiges neuropathologisches Merkmal von Morbus Alzheimer sind amyloide Plaques, die durch Aggregation des A β -Peptids zu Amyloidfibrillen mit einer gekreuzten β -Faltblattstruktur entstehen. Demzufolge wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit mithilfe der *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie, unter der wiederholten Anwendung des spezifischen fluoreszenten Markers Methoxy-X04, die Entstehungs- und Aggregationskinetik amyloider Plaques untersucht. Eine quantitative Auswertung von Plaquegrößen, -wachstumsraten und -dichten in zwei Altersgruppen der frühen und späten amyloiden Pathologie führte zur bisher detailliertesten *in vivo* Charakterisierung in einem Alzheimer-Mausmodell. Für eine präzise Messung der Plaquedichten wurde ein sehr großes Gehirnvolumen von 3 mm³ pro Gruppe untersucht. In einem Langzeitversuch über 15,5 Monate mit einer zeitlichen Auflösung von einer Woche wurde erstmals eine komplette Kinetik des Plaquewachstums in einem Mausmodell beschrieben, die den gleichen Verlauf einer Sigmoid-Funktion aufwies, wie er bereits *in vitro* und in Alzheimer-Patienten gezeigt wurde. Die Plaquedichte stieg asymptotisch mit dem Alter an und folgte einer exponentiellen, einphasigen Assoziationsfunktion. Neu entstandene Plaques wiesen mit Abstand die kleinste Plaquegröße auf, die mit zunehmendem Alter anstieg. Die lineare Plaquewachstumsrate, gemessen als Zuwachs des Plaqueradius pro Woche, sank mit ansteigendem Alter der Mäuse, was sich in einer negativen Korrelation der Plaquewachstumsrate mit der Plaquedichte widerspiegelte. Sehr große Plaques wurden früh in der Entstehungsphase gebildet und die Größe am Ende der Untersuchung korrelierte mit ihrer Wachstumsrate. In der frühen Phase der Plaqueentwicklung nahmen die Plaques mit einer maximalen Wachstumsrate zu, die nicht durch die A β -Konzentration limitiert war. Die Wachstumsraten individueller Plaques waren sehr breit verteilt, was auf einen Einfluss lokaler Faktoren schließen ließ. Dieser Befund wurde gestützt durch den Langzeitversuch, da kein Zusammenhang zwischen den Wachstumsraten benachbarter Plaques detektiert wurde. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen ein physiologisches Wachstumsmodell, in dem Plaques sehr langsam über große Zeiträume wachsen bis zum Erreichen eines Äquilibriums. Durch die nachgewiesenen Parallelen zu den Befunden von *in vitro* Studien und *in vivo* Ergebnissen von Alzheimer-Patienten stellen die beschriebenen Zusammenhänge eine wertvolle Grundlage für die Translation von Ergebnissen zwischen präklinischer und klinischer Forschung zur Entwicklung von A β -senkenden Therapien dar.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die Effekte einer passiven Immunisierung gegen das A β -Peptid oder A β -Oligomere untersucht. Nach einer zweimonatigen Antikörper-Behandlung wurden keine Unterschiede in der Plaquentstehungs- und Plaquewachstumskinetik gemessen. Eine in der Literatur beschriebene Akkumulation von A β -Oligomeren konnte durch eine *in vivo* Visualisierung mit einem hochspezifischen Antikörper gegen diese Molekülspezies nicht bestätigt werden. Lösliche A β -Peptide oder A β -Aggregate akkumulierten erwartungsgemäß um den amyloiden Kern von Plaques. Am Ende der Immunisierungsstudie wurde die synaptische Pathologie mittels immunhistochemischer Färbung der Prä- und Postsynapsen mit den Markern Synapsin und PSD-95 untersucht. Innerhalb amyloider Plaques wurden sehr niedrige Synapsendichten gemessen, die mit zunehmender Entfernung zum Plaque asymptotisch zu einem Plateau anstiegen. Diese Analyse zeigte erstmals, dass der Einflussbereich der toxischen Wirkung amyloider Plaques für Präsynapsen wesentlich größer ist als für Postsynapsen, was auf eine höhere Sensibilität von Präsynapsen schließen lässt. Abseits von Plaques im Cortex waren die Synapsendichten niedriger im Vergleich zu Wildtyptieren, wie durch den Vergleich der Plateaus gemessen wurde. Beide therapeutischen Antikörper zeigten eine partielle Normalisierung der Synapsendichte. Daraus folgt, dass die A β -Oligomere ursächlich für die Synapsenpathologie waren, da eine spezifische Neutralisierung dieser A β -Aggregate für einen Therapieeffekt ausreichte. Diese Ergebnisse bestätigen *in vivo* die toxische Wirkung von A β -Oligomeren auf Synapsen und beweisen eine mögliche Neutralisierung dieser löslichen A β -Aggregate durch eine passive Immunisierung.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia implying big economical and emotional burden for patients, their families and the whole economy due to a generally rising life expectancy. A reduction of costs and stress urgently requires disease-modifying therapies which are currently still lacking. Maybe the most accurate explanation for the molecular cause of the disease is reflected in the amyloid-cascade hypothesis, postulating the accumulation and aggregation of the A β peptide as central pathogenic event. Hence, synaptic pathology caused by A β oligomers, inflammatory reactions due to insoluble A β aggregates, namely amyloid plaques, progressive damage of synapses and neurons, oxidative stress, hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein tau, and finally neuron loss commonly occur as a result. Moreover, the A β peptide is constitutively produced in the brain by sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretase enzymes. In the present work, I studied the effects of human APP overexpression (with a Swedish mutation) on both synapses and the accumulation kinetics of amyloid plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease (Tg2576). This detailed characterization of the mouse model was then further utilized in a therapeutic study testing the passive immunization against the A β peptide or A β oligomers.

In the first part of this work, I investigated the effects of APP overexpression on dendritic spines forming the postsynaptic compartment of glutamatergic synapses on dendrites. As reporter animals, mice expressing the yellow-fluorescent protein YFP in a subset of cortical pyramidal neurons were used. Two-photon microscopy enabled the elaborate *in vivo* analysis of dendritic spines on apical dendrites of layer II/III and V neurons in the somatosensory cortex. Overexpression of APP induced a locally differential effect on the spine density with no changes being observed in layer II/III yet increased spine numbers calculated in layer V neurons. A more detailed characterization revealed a majority of stable spines as responsible for the rise in spine densities; however, no further changes in the spine count were detected over a period of six weeks. Moreover, dendritic spine morphology was also unaltered. Summarized, these results hint to a possible physiological role of APP and/or its

proteolytic fragments at the synapse.

Amyloid plaques, one of the two characteristic neuropathological hallmarks of AD, are generated by aggregation of the A β peptide into amyloid fibrils with a crossed β -sheet structure. Thus, in the second part of this work, the formation and aggregation kinetics of amyloid plaques were measured by means of *in vivo* two-photon microscopy and repeated use of the fluorescent marker methoxy-X04. Such extensive quantitative analysis of plaque sizes, plaque growth rates and plaque densities as performed for two different age groups, depicting models for early and late stage AD pathology, allowed the most detailed *in vivo* characterization so far. For a precise measurement of plaque densities, in each group I analysed large brain volumes of 3 mm³. Interestingly, the complete range of plaque growth kinetics as imaged in a weekly interval for over 15,5 month showed the same trend like that of a sigmoid function, a finding that accords with *in vitro* studies and AD patients. Moreover, the plaque densities increased asymptotically with higher age and followed an exponential, one-phase association function. Newly-formed plaques showed by far the smallest plaque size, which also continued to rise upon ageing. In contrast, the linear plaque growth rate, measured as weekly increase in the plaque radius, decreased with increasing age of the animal. This finding was also reflected in a negative correlation between plaque growth rate and plaque density. In addition, huge plaques were produced early in the developmental phase, and the final size they reached at the end of the experiment correlated with the plaque growth rate. In the early phase of plaque formation, the plaques expanded with a maximal growth rate that was not limited by the A β concentration. Furthermore, the growth rates of individual plaques were widely distributed assuming the influence of local factors. This finding was supported by the long-term study over 15,5 months showing no correlation between the growth rates of neighbouring plaques. Conclusively, the results of this investigation demonstrate a growth model, in which plaques grow very slowly over longer periods until they reach equilibrium. Thus, both the described relationships and verified parallels to *in vitro* studies and findings in AD patients shape an important basis for the translation of results between preclinical and clinical research and for the final development of A β -lowering therapies.

In the third part of this thesis, I analysed the effects of a passive immunization against A β peptides or A β oligomers. A two-month long antibody treatment did neither affect the plaque formation nor its growth kinetics. Moreover, A β oligomer assemblies as described previously in literature were not detected using *in vivo* vi-

sualization with a highly specific antibody against these molecular species. Instead, soluble A β peptides or A β aggregates accumulated around the plaque core as expected. At the end of the immunization study, the synaptic pathology was analysed by immunohistochemical stainings of pre- and postsynapses using the markers synapsin and PSD-95. Here, very low synapse densities were measured inside amyloid plaques, which increased asymptotically until culmination of a plateau. This analysis showed for the first time that the influenced area of toxic effects of amyloid plaques is higher for presynapses than for postsynapses, suggesting a higher sensitivity of presynapses. Apart from plaques, the synapse densities were lower in AD mice compared to wild-type animals as identified by comparison of the estimated plateaus. Both therapeutic antibodies showed a partial normalization of the synapse density. Thus, A β oligomers were likely causative for the synapse pathology since the specific neutralization of A β aggregates sufficiently achieved a therapeutic effect. In summary, these findings verify the toxic effect of A β oligomers on synapses *in vivo* and support a possible neutralization of soluble A β aggregates by passive immunization.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

1.1.1 Historie und epidemiologische Aspekte

Im Jahre 1906 stellte der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer bei einer Konferenz in Tübingen den ersten Fall einer damals noch unbekanntem Krankheit vor, die später seinen Namen tragen sollte. Die Patientin Auguste Deter „... bot schon klinisch ein so abweichendes Bild ...“, dass sich dieser Fall „... unter keiner der bekannten Krankheiten einreihen ließ...“. Alzheimer schrieb in der ersten Publikation weiter: „Sie ist zeitlich und örtlich gänzlich desorientiert.“ und „Ihre Merkfähigkeit ist aufs schwerste gestört“. Die Sektion des Gehirns, der mit 55 Jahren verstorbenen Auguste Deter, zeigte eine gleichmäßige Atrophie. Zwei histologische Befunde grenzten den Fall weiter von den bisher bekannten Krankheiten ab. In den Gehirnschnitten fand Alzheimer „miliare Herdchen“ eines in die Hirnrinde eingelagerten Stoffes und ungewöhnlich stark angefärbte Neurofibrillen (Alzheimer, 1907), die heute amyloide Plaques und neurofibrilläre Tangles (eng. für Knäuel) genannt werden (Abb. 1.1 a-d auf der nächsten Seite).

Mehr als 100 Jahre später leben in Deutschland rund 1,3 Millionen Menschen mit Demenz, deren größter Anteil mit zwei Drittel dem Typ Alzheimer zugeordnet werden kann. Aufgrund des demografischen Wandels durch weniger Nachwuchs und steigende Lebenserwartung könnte sich dieser Wert im Jahr 2050 verdoppeln (Sütterlin u. a., 2011). Die Kosten durch Demenz beliefen sich im Jahr 2010 weltweit auf mehr als 600 Milliarden US-Dollar für die insgesamt 36 Millionen Menschen, die mit einer Demenz leben (Batsch u. a., 2012; Prince u. a., 2011). Im Vergleich zu anderen weit verbreiteten Krankheiten, wie Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, sind die direkten und indirekten Kosten mittlerweile wesentlich höher (Abbott, 2011). Diese große ökonomische und emotionale Belastung für Patienten, deren Familien und für die gesamte Gesellschaft erfordern die dringende Entwicklung neuartiger Therapien, die den Krankheitsverlauf abmildern können (Huang u. a., 2012).

1.1.2 Klinische Symptome

Morbus Alzheimer ist eine progressive Erkrankung deren Verlauf über mehrere Jahre fortschreitet. Es werden im allgemeinen drei Stadien unterschieden – von einer leichten, über eine mittlere bis zu einer schweren Demenz – die durchschnittlich jeweils drei Jahre dauern (Sütterlin u. a., 2011). Die Krankheit beginnt mit einer leichten kognitiven Einschränkung, die sich bei den meisten Alzheimer-Patienten

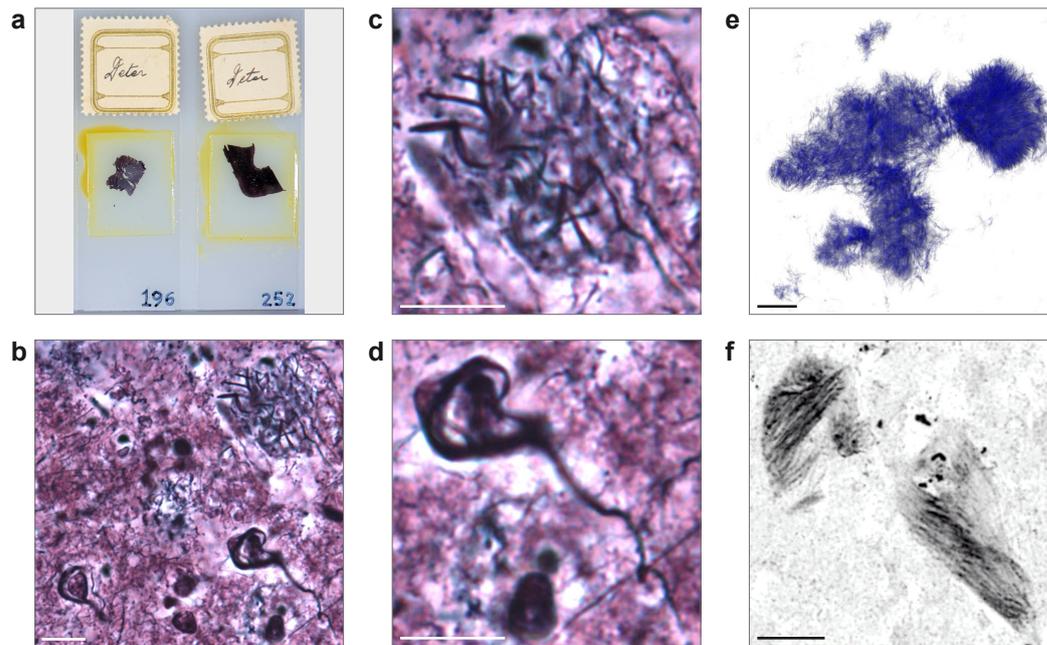


Abb. 1.1: Die histopathologischen Merkmale der ersten Alzheimer-Patientin Auguste Deter. In **a** sind histologische Gehirnpräparate der ersten Alzheimer-Patientin Auguste Deter zu sehen, die im Jahr 1997 im Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München wieder aufgefunden worden sind (Graeber u. a., 1999). Die Gehirnpräparate wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. h. c. Hans Kretschmar FRCPath für die Aufnahmen unter **a-d** zur Verfügung gestellt. Die Übersichtsaufnahme zeigt das Bild einer Bielschowsky Silberfärbung mit den beiden von Alois Alzheimer identifizierten charakteristischen Kennzeichen, die er als „miliare Herde“ und „aufgeknäuelte Bündel von Fibrillen“ beschrieb (**b**). In den vergrößerten Bildausschnitten sind die extrazellulären neuritischen Plaques (**c**) und intrazellulären neurofibrillären Tangles (**d**) zu sehen, wie die Merkmale heute bezeichnet werden. Zur Färbung der amyloiden Fibrillen können auch Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die die Aufnahme sehr kontrastreicher Bilder ermöglicht. In **e** und **f** sind entsprechende Fluoreszenzaufnahmen eines amyloiden Plaques und eines neurofibrillären Tangle zu sehen. Die Maßstäbe repräsentieren 5 μm .

in einer Störung des Kurzzeitgedächtnisses äußert. Im mittleren Stadium ist eine selbständige Lebensführung mit personeller Unterstützung möglich. Neue Informationen werden zunehmend schwerer behalten und viel schneller wieder vergessen. Zudem verschlechtern sich das Ausüben praktischer Tätigkeiten und logisches Denken deutlich. Im schweren Stadium der Krankheit sind fast alle kognitiven Fähigkeiten verloren gegangen. Die Patienten benötigen eine intensive Pflege rund um die Uhr und ein Großteil von ihnen ist bettlägerig (Tarawneh u. a., 2012; Weintraub u. a., 2012). Durch neuropsychologische Tests kann Morbus Alzheimer mit hoher Genauigkeit diagnostiziert und von anderen Demenzen abgegrenzt werden (Tarawneh u. a., 2012). Die Phase der klinischen Symptome kann in der gesamten Ätiologie der Krankheit bereits als mittleres bis spätes Stadium eingeordnet werden. In Bio-

markerstudien wurden erste Veränderungen im Gehirn bereits 25 Jahre vor Beginn der zu erwartenden klinischen Symptome in Menschen detektiert, deren Familien an einer vererbaren Form von Morbus Alzheimer leiden (Bateman u. a., 2012). Aus diesem Grund ist es sehr wichtig neue Diagnoseverfahren zu entwickeln, die mit einer hohen Genauigkeit unterscheiden können, ob ein Patient später an Morbus Alzheimer erkrankt oder nicht (Hampel u. a., 2010; Mattsson u. a., 2009).

1.1.3 Neuropathologische Merkmale

Die klassischen neuropathologischen Merkmale von Morbus Alzheimer sind amyloide Plaques, neurofibrilläre Tangles und Neuropilfäden (Iqbal u. a., 2002; Mandelkow u. a., 1998; Terry, 1994; Trojanowski u. a., 2000). Diese Läsionen führen zu einer Immunreaktion, die durch eine Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia gekennzeichnet ist (Beach u. a., 1989; Itagaki u. a., 1989; Masliah u. a., 1991; Rogers u. a., 1988). Häufig kommt es zum gleichzeitigen Auftreten einer zerebralen Amyloidangiopathie (Mandybur, 1975; Vinters u. a., 1996). Zusätzlich ist Morbus Alzheimer durch einen Verlust an Neuronen, Neuropil und Synapsen charakterisiert (Serrano-Pozo u. a., 2011).

Extrazelluläre Plaques

Den Hauptbestandteil von Plaques stellt das A β -Peptid dar, das durch Aggregation zur Bildung der extrazellulären Ablagerungen führt (Glennner u. a., 1984b; Masters u. a., 2006, 1985). Das A β -Peptid entsteht durch die enzymatische Proteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins (APP, siehe Abschnitt 1.2 auf Seite 8). Plaques besitzen eine poröse Struktur (Cruz u. a., 1997) und eine annähernd sphärische Form, deren Durchmesser bis zu 200 μ m betragen kann (Cummings u. a., 1998). Es können verschiedene Arten von Plaques unterschieden werden: Klassische „Cored-Plaques“ bestehen aus einem verdichteten Kern aus Amyloidfibrillen des A β -Peptids, der von einer locker gebauten Mantelzone umhüllt ist. Neuritische Plaques enthalten zusätzlich dystrophe Neuriten (Dickson, 1997; Thal u. a., 2005). Die Amyloidfibrillen des Plaque-Kerns weisen eine sehr dichte und hochgeordnete, gekreuzte β -Faltblattstruktur auf und können mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Congo Red, Thioflavin S, Methoxy-X04) angefärbt werden (Eisenberg u. a., 2012; Fändrich, 2007; Fändrich u. a., 2011; Meinhardt u. a., 2009). In Abbildung 1.1 e auf der vorherigen Seite ist eine supraauflösende Fluoreszenzaufnahme dargestellt, die mithilfe

strukturiertes Beleuchtung generiert wurde und die die poröse, fibrilläre Struktur verdeutlicht. Diese Art von Plaques werden in der vorliegenden Arbeit allgemein als amyloide Plaques oder β -Amyloid bezeichnet. Weiterhin werden noch diffuse Plaques unterschieden, die keinen amyloiden Kern besitzen und deren A β -Ablagerungen relativ gleichmäßig im Plaque verteilt sind (Thal u. a., 2005). Diffuse Plaques können nur durch Immunfärbungen gegen das A β -Peptid detektiert werden, da sie keine Amyloidfibrillen aufweisen und nicht mit den dafür spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden können (Fändrich, 2007). Die Verteilung der Plaques im Gehirn ist nicht stochastisch, sondern verläuft in verschiedenen Phasen. Als erste Region ist der Isocortex betroffen (Phase 1), gefolgt vom Hippocampus und dem entorhinalen Cortex (Phase 2). In Phase 3 können Plaques im Striatum und Zwischenhirn detektiert werden. Die Plauepathologie schreitet weiter voran in verschiedene Kerne des Stammhirns (Phase 4) bis in Phase 5 weitere Kerne des Stammhirns und Teile des Cerebellums betroffen sind (Duyckaerts u. a., 2009; Thal u. a., 2006, 2002). Der Verlust an kognitiven Fähigkeiten in Alzheimer-Patienten korreliert mit der Schwere der Pathologie neuritischer Plaques (Nelson u. a., 2012). Für die präklinische Erforschung der Plaque-Pathologie werden transgene Mausmodelle verwendet, in denen die Entwicklung und Morphologie amyloider Plaques sehr gut reproduziert wird (Duyckaerts u. a., 2008).

Neurofibrilläre Tangles

Neurofibrilläre Tangles sind intrazelluläre Einschlüsse in Neuronen, die aus dem aggregierten Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau bestehen (Wischik u. a., 1988). Die physiologische Funktion von Tau ist die Stabilisierung von neuronalen Mikrotubuli bei der Entwicklung von Zellfortsätzen, dem Aufbau der Zellpolarität und dem intrazellulären Transport. Es ist hauptsächlich in Axonen lokalisiert (Drewes u. a., 1998). Während der Alzheimerschen Erkrankung wird Tau hyperphosphoryliert, wodurch die Bindungen zu den Mikrotubuli geschwächt und diese destabilisiert werden. Infolgedessen kommt es zum Erliegen des axonalen Transports und zu einer Umverteilung von Tau in das somatodendritische Kompartiment (Mandelkow u. a., 1995, 1994, 1998). Die Hyperphosphorylierung von Tau führt weiterhin zur Aggregation des Proteins, das gepaarte helikale Filamente mit einer gekreuzten β -Faltblattstruktur bildet, wie das A β -Peptid (Mandelkow u. a., 2012; Meinhardt u. a., 2009). Diese Aggregate bilden die neurofibrillären Tangles und sind in dystrophen Neuriten vorhanden, die als Neuropilfäden bezeichnet werden (Abb. 1.1 d, f

auf Seite 3). Innerhalb neuritischer Plaques und in deren unmittelbarer Umgebung sind solche abnormalen Neuriten lokalisiert (Holtzman u. a., 2011b). Auch die Tau-Pathologie zeigt ein typisches Muster der sequentiellen Entwicklung in verschiedenen Hirnregionen, die nach ihrem Entdecker „Braak Stages“ genannt werden (Braak u. a., 1991, 1997). Die ersten Aggregate von Tau werden im trans-entorhinalen und entorhinalen Cortex gebildet (Phase I und II), gefolgt vom Hippocampus (Phase III und IV) und dem Isocortex (Phase V und VI). Interessanterweise korreliert die Tau-Pathologie besser mit dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten als die Pathologie neuritischer Plaques (Nelson u. a., 2012). Aus diesem Grund wurde die Einteilung nach dem Schema von Braak für die *post mortem* Routineuntersuchung eingeführt (Duyckaerts u. a., 1997).

Verlust von Neuronen und Synapsen

Neben den klassischen neuropathologischen Merkmalen sind Verluste von Neuronen und Synapsen zu verzeichnen. Beide pathologischen Prozesse in Kombination mit der Degeneration von Neuriten sind für eine makroskopische Atrophie des Gehirns in Form eines Volumen- und Gewichtverlustes verantwortlich (Huang u. a., 2012; Serrano-Pozo u. a., 2011). Interessanterweise überlappen sich die Regionen, in denen Neuronen und Synapsen untergehen, mit der Verteilung der neurofibrillären Tangles und Neuropilfäden. Aus diesem Grund wird der Untergang von Neuronen und Synapsen als Hauptursache für den Verlust kognitiver Funktionen angesehen (Duyckaerts u. a., 2009; Holtzman u. a., 2011b).

Besonders verletzliche Neurone, die bei der Alzheimerschen Erkrankung betroffen sind, liegen in Schicht II des entorhinalen Cortex, der pyramidalen Schicht des Hippocampus und bestimmte Regionen im temporalen, parietalen und frontalen Neocortex (Gómez-Isla u. a., 1996; Hof u. a., 1990a,b; Whitehouse u. a., 1982). Die Mehrheit der untergegangenen Neurone verwenden Glutamat als Neurotransmitter, aber es gibt auch einen Verlust cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirns und von noradrenergen Neuronen im Locus Ceruleus (Busch u. a., 1997; Coyle u. a., 1983; Davies u. a., 1976).

Der Verlust von Synapsen wurde in zahlreichen Elektronenmikroskop-Studien und immunhistochemischen Studien belegt, in denen verschiedene prä- oder postsynaptische Proteine gefärbt wurden (Serrano-Pozo u. a., 2012). Ein Vergleich der Synapsendichten bzw. Synapsenanzahl mit dem *ante mortem* gemessenen kognitiven Status der Alzheimer-Patienten zeigte die beste Korrelation von allen neuropatho-

logischen Merkmalen. Zudem erscheint der Verlust von Synapsen als relativ frühes Ereignis im klinischen Verlauf der Krankheit (DeKosky u. a., 1990; Heinonen u. a., 1995; Honer u. a., 1992; Masliah u. a., 1989; Scheff u. a., 1990, 2003, 2007, 1993; Terry u. a., 1991). Weiterhin wurde vom Untergang dendritischer Spines berichtet (el Hachimi u. a., 1990; Ferrer u. a., 1990; Fiala u. a., 2002; Knobloch u. a., 2008; Penzes u. a., 2011), die als ein morphologisches Korrelat von Lernen und Gedächtnis angenommen werden (Alvarez u. a., 2007; Nimchinsky u. a., 2002; Yuste, 2011; Yuste u. a., 2001b). In der Nähe amyloider Plaques ist die Dichte dendritischer Spines ebenfalls reduziert (Grutzendler u. a., 2007) und innerhalb amyloider Plaques sind nahezu keine Synapsen zu detektieren (Lassmann u. a., 1992). Der Verlust von Synapsen wurde auch für transgene Alzheimer-Mausmodelle berichtet, sowohl abseits von amyloiden Plaques als auch in deren Nähe (Knobloch u. a., 2008; Pozueta u. a., 2012; Spires-Jones u. a., 2012). Im Vergleich zum Alzheimer-Patienten sind die Synapsenverluste im Tiermodell nicht so ausgeprägt und teilweise wurden widersprüchliche Ergebnisse publiziert (Duyckaerts u. a., 2008). Hinsichtlich dieses Aspekts scheinen die Alzheimer-Mausmodelle die präklinische Phase der humanen Pathologie widerzuspiegeln, währenddessen die A β -Akkumulation stattfindet, ohne klinische Symptome hervorzurufen (Holtzman u. a., 2011a).

1.1.4 Genetische und andere Risikofaktoren

Morbus Alzheimer wird wahrscheinlich durch komplexe Wechselwirkungen von genetischen, epigenetischen und umweltbedingten Faktoren verursacht (Huang u. a., 2012). Grundsätzlich können zwei Arten der Alzheimerschen Krankheit unterschieden werden. Die autosomal-dominant vererbten Varianten beruhen auf Mutationen in den Genen des Amyloid-Vorläuferproteins und der Präseniline 1 und 2, den katalytischen Untereinheiten der γ -Sekretase (siehe Abschnitt 1.2 auf der nächsten Seite), die zu einem frühzeitigen Ausbruch der Krankheit vor einem Alter von 60 Jahren führen (Bertram u. a., 2010; O'Brien u. a., 2011). Diese Mutationen bedingen weniger als ein Prozent der Alzheimerfälle (Campion u. a., 1999), während die Mehrheit der Fälle durch eine sporadische Form hervorgerufen wird (Tanzi, 2012). Interessant ist die sehr hohe Ähnlichkeit der Pathologien beider Formen von Morbus Alzheimer (Shepherd u. a., 2009). Die Wahrscheinlichkeit an der sporadischen Variante zu erkranken, wird durch weitere Suszeptibilitätsgene erhöht, von denen Apolipoprotein E (ApoE) mit Abstand die größte Bedeutung hat (Carrasquillo u. a., 2009; Hollingworth u. a., 2011; Naj u. a., 2011; Schellenberg u. a., 2012). Insgesamt

wird der Einfluss genetischer Faktoren bei der sporadischen Form auf 60 bis 80 % geschätzt (Gatz u. a., 2006). Das Hauptrisiko an sporadischem Morbus Alzheimer zu erkranken, birgt das Altern an sich. Die Wahrscheinlichkeit verdoppelt sich alle fünf Jahre ab einem Alter von 65 Jahren (Ferri u. a., 2005). Zusätzlich beeinflussen Lebensgewohnheiten wie Bildung, kognitive Beanspruchung, der Body-Mass-Index, körperliche Aktivität, Rauchen und Alkoholkonsum die Prävalenz einer Erkrankung (Y. Lee u. a., 2010; Valenzuela u. a., 2006). Als weitere Risikofaktoren zählen Kopfverletzungen und Schlaganfälle (Savva u. a., 2010; Sundström u. a., 2004, 2007).

1.2 Das Amyloid-Vorläuferprotein APP

1.2.1 Struktur, Lokalisation und Prozessierung von APP

Das Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP) ist ein Typ-I orientiertes Transmembranprotein, dessen Gen beim Menschen auf dem Chromosom 21 lokalisiert ist (Kang u. a., 1987). In Säugetieren bildet APP zusammen mit den beiden Homologen APLP1 und APLP2 (amyloid precursor like protein 1/2) die APP-Proteinfamilie (Wasco u. a., 1992, 1993). Es gibt mehrere Isoformen des Proteins, wobei die 695 Aminosäuren lange Variante vorwiegend im Gehirn exprimiert wird, weshalb dieser Isoform die meiste Beachtung innerhalb der Alzheimer-Forschung zukommt (Tanaka u. a., 1988, 1989). APP besitzt eine relativ große extrazelluläre und eine kurze zytosolische Domäne deren verbindende Sequenz einmal die Zellmembran passiert (Abb. 1.2 auf der nächsten Seite). Die Reifung des Proteins findet im sekretorischen Pfad statt, währenddessen posttranslationale Modifizierungen, wie Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung, erfolgen können (Haass u. a., 2012). APP wurde in den Membranen von synaptischen Präparationen detektiert (Kirazov u. a., 2001) und wurde weiter in der postsynaptischen Dichte, Axonen und Dendriten lokalisiert (Koo u. a., 1990; Schubert u. a., 1991; Shigematsu u. a., 1992).

Bei der proteolytischen Prozessierung von APP können zwei prinzipielle Wege unterschieden werden – ein amyloidogener Weg, bei dem das A β -Peptid generiert wird und ein nicht-amyloidogener Weg. APP enthält drei Schnittstellen (Abb. 1.2 b) die durch die Proteaseaktivität der α -, β - und γ -Sekretasen geschnitten werden und zu einer komplexen Prozessierung führen (Haass, 2004). Die Generierung des A β -Peptids wird durch die Aktivität der β -Sekretase in Endosomen initiiert, bei der ein großer Teil der Ektodomäne von APP (APPs β) in den extrazellulären Raum entlassen wird und ein Carboxy-terminales Fragment (β CTF oder C99)

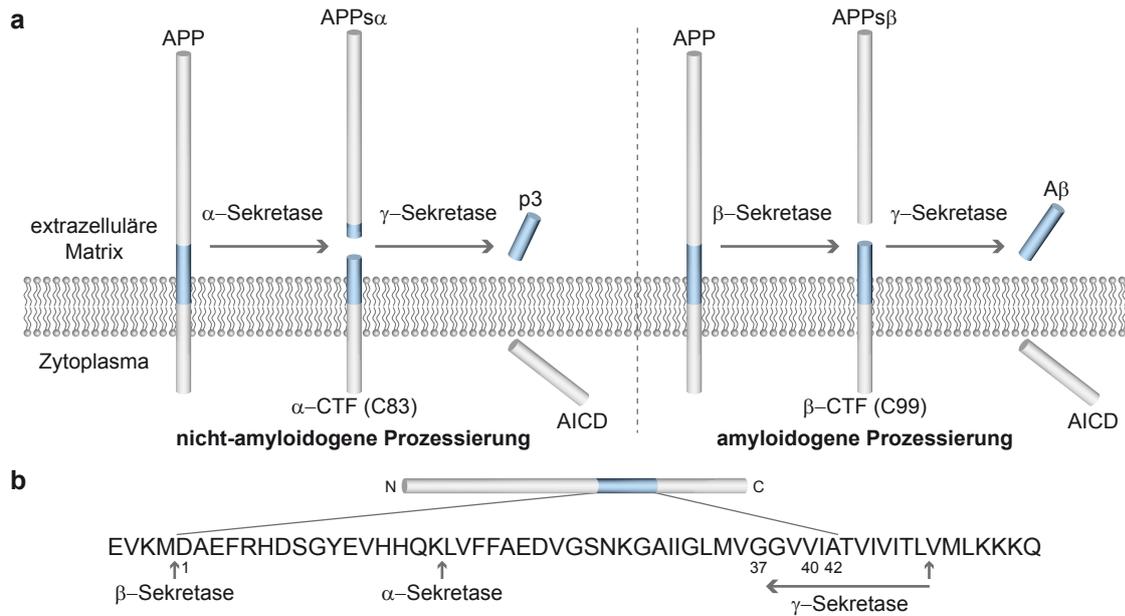


Abb. 1.2: Die sequentielle Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins APP. Die sequentielle Spaltung von APP erfolgt in zwei Prozessierungspfaden (a). Bei der amyloidogenen Prozessierung wird die Ektodomäne (APPs β) von der β -Sekretase abgespalten und in den extrazellulären Raum entlassen. Die anschließende Prozessierung des membranständigen C-terminalen Fragments (β CTF) durch die γ -Sekretase wird die APP intrazelluläre Domäne (AICD) und das für die Alzheimersche Erkrankung wichtige A β -Peptid (blaue Domäne) freigesetzt. Alternativ wird APP bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung innerhalb der Sequenz des A β -Peptids von der α -Sekretase gespalten, wodurch die APPs α -Ektodomäne in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Der folgende Schnitt des membranständigen C-terminalen Fragments (α CTF) durch die γ -Sekretase befreit die APP intrazelluläre Domäne und das p3 Peptid. Die Aminosäuresequenz des A β -Peptids und angrenzende Bereiche inklusive der Schnittstellen von α -, β und γ -Sekretenasen sind in b dargestellt. Aufgrund des heterogenen Schnittbereiches der γ -Sekretenase entstehen unterschiedliche A β -Peptide mit Längen von 37 bis 43 Aminosäuren (Schnittrichtung indiziert durch den Pfeil).

in der Membran verbleibt (Abb.1.2a auf dieser Seite). Dieses membranständige Fragment wird anschließend durch die γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne in Endosomen oder an der Zelloberfläche gespalten, wodurch das A β -Peptid und die intrazelluläre Domäne (AICD, APP intracellular domain) freigesetzt werden (Haass u. a., 2012, 1993). Die Prozessierung durch die γ -Sekretase erfolgt in mehreren Schritten, wodurch A β -Peptide mit Längen von 37 bis 43 Aminosäuren entstehen (Abb. 1.2b). Für die Aktivität der β -Sekretase ist die membranständige Aspartat-Endopeptidase BACE1 verantwortlich (Hussain u. a., 1999; Lin u. a., 2000; Sinha u. a., 1999; Vassar u. a., 1999; R. Yan u. a., 1999), während sich die ebenfalls membranständige γ -Sekretase aus vier Untereinheiten zusammensetzt (De Strooper, 2003). Die γ -Sekretase besitzt die außergewöhnliche Eigenschaft, Peptidbindungen

von Transmembranproteinen in der hydrophoben Umgebung einer Lipidmembran zu spalten (Haass u. a., 1992; Shoji u. a., 1992). Das katalytische Zentrum der γ -Sekretase bilden jeweils die Präseniline PS-1 oder PS-2 (De Strooper, 2010; De Strooper u. a., 1998).

Im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg wird APP durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Sequenz gespalten, was zur Sekretion der löslichen extrazellulären APPs α -Ektodomäne führt (Esch u. a., 1990; Sisodia u. a., 1990). Die anschließende Spaltung des membranständigen α CTF (C83) durch die γ -Sekretase resultiert wiederum in der Freisetzung der intrazellulären Domäne (AICD) und des Peptids p3, das für die Alzheimersche Erkrankung unbedeutend ist (Abb. 1.2 a). Für die Proteinase der ADAM-Familie (a disintegrin and metalloproteinase) wurde eine α -Sekretase-Aktivität gezeigt (Allinson u. a., 2003), von denen ADAM10 die physiologisch relevante Funktion für die Prozessierung von APP in Neuronen auszuführen scheint (Kuhn u. a., 2010).

1.2.2 Funktionen von APP und dessen proteolytische Fragmente

Für die Erforschung des Einflusses von APP und dessen proteolytischen Fragmenten auf die Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung ist es bedeutend, auch die normalen physiologischen Funktionen zu kennen. Eine Analyse der Struktur von APP lässt eine Funktion als Zelloberflächenrezeptor vermuten (Turner u. a., 2003). Tatsächlich wurden einige mögliche Liganden für die extrazelluläre Domäne beschrieben, was diese Hypothese belegt (Zheng u. a., 2006). Zusätzlich gibt es eine sehr große Ähnlichkeit zum Notch-Rezeptor, der nach Liganden-Bindung ebenfalls von der γ -Sekretase gespalten wird und zur Signaltransduktion im Zellkern durch die freigesetzte intrazelluläre Domäne NICD (Notch intracellular domain) führt (Selkoe u. a., 2003). Diese Ähnlichkeit zum Notch-Signalweg unterstützt die These der Funktion von APP als Zelloberflächenrezeptor weiter (Zheng u. a., 2011). Weiterhin wurde für die extrazelluläre Domäne eine Funktion als Zelladhäsionsprotein beschrieben, die durch transsynaptische Interaktionen von prä- und postsynaptischem APP charakterisiert ist und zur Stabilisierung von Synapsen beitragen könnte (Hoe u. a., 2012; Z. Wang u. a., 2009). Ein weiteres Indiz für eine synaptische Funktion zeigten Studien in APP Knock-out Mäusen, in denen eine veränderte Dichte dendritischer Spines gemessen wurde (Bittner u. a., 2009; K. J. Lee u. a., 2010). Für die APP-Ektodomäne wurden synaptotrophe Effekte berichtet, einschließlich einer erhöhten synaptischen Dichte, eines geförderten Auswachsens von Neuriten und ei-

nes verbesserten Lernens (Gakhar-Koppole u. a., 2008; Meziane u. a., 1998). Das sezernierte A β -Peptid zeigte eine konzentrationsabhängige modulierende Wirkung auf die synaptische Transmission, die durch höhere Konzentrationen des A β -Peptids gedämpft wurde (Kamenetz u. a., 2003; Puzzo u. a., 2013, 2011, 2008). Zusätzlich kann die Freisetzungswahrscheinlichkeit von synaptischen Vesikeln durch das A β -Peptid moduliert werden (Abramov u. a., 2009).

1.2.3 Aggregation des A β -Peptids

A β -Peptide besitzen die Eigenschaft zu aggregieren und amyloide Fibrillen zu bilden, die eine hochgeordnete, gekreuzte β -Faltblattstruktur aufweisen. Amyloide Fibrillen stellen den Endpunkt eines komplexen Aggregationsprozesses dar, der verschiedene Zwischenprodukte beinhaltet, wie A β -Dimere, A β -Oligomere, Globulomere und Protofibrillen (Fändrich u. a., 2011). Der Aggregationsprozess des A β -Peptids ist abhängig von der Bildung eines initialen Aggregationskeimes, dessen Bildungswahrscheinlichkeit thermodynamisch unvorteilhaft ist, wie in zahlreichen *in vitro* Studien gezeigt wurde (Jarrett u. a., 1993). Daraus resultiert eine Verzögerungsphase bis der erste Aggregationskeim gebildet wird (Abb. 1.3 auf der nächsten Seite). Die weitere Polymerisation des Aggregationskeimes zu amyloiden Fibrillen ist thermodynamisch sehr vorteilhaft, weshalb sich eine exponentielle Wachstumsphase anschließt bis ein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht wird (Abb. 1.3). Eine Polymerisation zu amyloiden Fibrillen ist nur oberhalb einer kritischen Mindestkonzentration an Monomer möglich (Jarrett u. a., 1993; Teplow, 1998). Durch die Einbringung von vorgeformten Aggregationskeimen, dem sogenannten „Seeding“, kann die Verzögerungsphase überbrückt werden und die Polymerisation beginnt sofort (Harper u. a., 1997). In gleicher Weise korreliert die Dauer der Verzögerungsphase invers mit der Konzentration an Monomer (Pellarin u. a., 2006). Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist ebenfalls abhängig von der Monomerkonzentration und besitzt eine Obergrenze, ab der keine höheren Polymerisationsgeschwindigkeiten bei weiterer Erhöhung der Monomerkonzentration zu messen sind (Lomakin u. a., 1996). Aufgrund ihres heterogenen Längenpolymorphismus zeigen die verschiedenen A β -Peptide (A β ₄₀, A β ₄₂, ...) ein unterschiedliches Aggregationsverhalten. Es wurde berichtet, dass im Vergleich zu kürzeren Peptiden speziell das hydrophobe A β ₄₂-Peptid essentiell für die Bildung amyloider Plaques im Mausmodell ist (McGowan u. a., 2005). Weiterhin könnte die Bildung von Aggregationskeimen *in vivo* durch Interaktionen mit Lipidmembranen (Murphy, 2007)

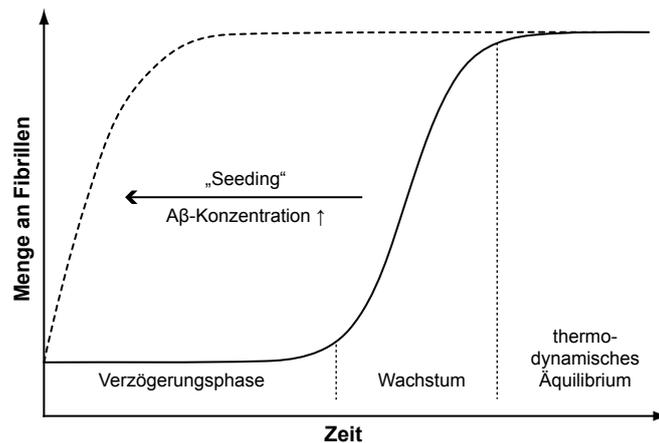


Abb. 1.3: Die in vitro Aggregationskinetik des Aβ-Peptids. Der Aggregationsprozess des Aβ-Peptids zu amyloiden Fibrillen ist abhängig von der Bildung eines Aggregationskeimes. Dieser Prozess ist thermodynamisch unvorteilhaft, weshalb eine Verzögerungsphase existiert. Wenn ein Aggregationskeim gebildet wurde, schließt sich eine exponentielle Wachstumsphase an, da dieser Prozess thermodynamisch sehr vorteilhaft ist (durchgezogene schwarze Linie repräsentiert die Menge an Fibrillen). Die Fibrillen wachsen weiter, bis ein thermodynamisches Äquilibrium zwischen Fibrillen und Monomeren erreicht ist. Durch die Zugabe von vorgeformten Aggregationskeimen („Seeding“) kann die Verzögerungsphase überbrückt oder durch die Erhöhung der Monomerkonzentration verkürzt werden (gestrichelte schwarze Linie).

oder die Akkumulation des Aβ-Peptids in Neuronen begünstigt werden (Gouras u. a., 2005).

1.3 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (kurz: Amyloid-Hypothese) wurde von John A. Hardy und Dennis J. Selkoe in den Jahren 1991/1992 postuliert und beschreibt die Sequenz der pathologischen Vorgänge bei der Alzheimerschen Erkrankung (Hardy u. a., 1991, 1992; Selkoe, 1991). Als zentrales Ereignis für diese verheerende neurodegenerative Erkrankung wurde die Akkumulation des Aβ-Peptids inklusive ihrer Ablagerung in Form von amyloiden Plaques identifiziert. In einer weiterentwickelten Form der Amyloid-Hypothese wird folgende Sequenz zusammengefasst (Haass u. a., 2007; Hardy u. a., 2002): Die sukzessive Akkumulation und Aggregation des kleinen, hydrophoben Aβ-Peptids initiiert eine langsame, aber tödliche Kaskade von Ereignissen. Toxische Aβ-Oligomere führen zu ersten subtilen Störungen der synaptischen Funktionen. Aufgrund der Bildung von unlöslichen Aggregaten kommt es zu einer Immunreaktion, die durch aktivierte Mikroglia und Astrozyten charakterisiert ist. Infolgedessen wird das normalerweise lösliche Protein Tau hyperphosphoryliert,

was zur Oligomerisierung und zur Bildung unlöslicher Aggregate führt. Das weitere Fortschreiten der Pathologie führt zu einem progressiven Verlust von Neuronen, der mit mannigfaltigen Neurotransmitterdefizienzen assoziiert ist. Als Ergebnis entsteht eine Alzheimersche Demenz mit einer Plaque- und Tangle-Pathologie (siehe Abb. 1.4 auf Seite 15).

Mehrere Entdeckungen und deren Verbindungen zur Alzheimer-Pathologie bereiteten den Weg zur Postulierung der Amyloid-Hypothese. Die stärksten Argumente für die Amyloid-Hypothese gründen, neben der Identifizierung des A β -Peptids als Hauptbestandteil von amyloiden Plaques und zerebraler Amyloidangiopathie (Glennner u. a., 1984a,b; Masters u. a., 1985) vorwiegend auf genetischen Befunden. Die Klonierung des APP-Gens und dessen Lokalisation auf dem Chromosom 21 war ein weiterer wichtiger Schritt zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Krankheit (Goldgaber u. a., 1987; Kang u. a., 1987; Robakis u. a., 1987; Tanzi u. a., 1987). In Kombination mit der früheren Entdeckung, dass das Down-Syndrom (Trisomie 21) unweigerlich zu einer frühen Neuropathologie der Alzheimerschen Erkrankung führt, wurde die zentrale Bedeutung der Akkumulation des A β -Peptids abgeleitet (Hardy u. a., 2002; Olson u. a., 1969). Aufgrund einer weiteren Kopie des Chromosoms 21 beim Down-Syndrom ist die A β -Produktion erhöht, was zu einer Ablagerung amyloider Plaques ab einem Alter von 35 Jahren und in fast allen Individuen zu einer Demenz ab einem Alter von 50 Jahren führt (F. Lai u. a., 1989; Wisniewski u. a., 1985). Im Einklang mit der Amyloid-Hypothese wurden erste Mutationen in dem Gen von APP entdeckt, die mit einer familiären vererbbaaren Form der Alzheimerschen Erkrankung assoziiert waren (Goate u. a., 1991; Mullan u. a., 1992). Sehr viele weitere Mutationen wurden für APP berichtet, die alle in der Region der Schnittstellen der β - und γ -Sekretase lokalisiert sind. Die meisten Mutationen wurden in den Genen der katalytischen Untereinheiten PS-1 und PS-2 der γ -Sekretase entdeckt (O'Brien u. a., 2011). Grundsätzlich resultieren diese Mutationen in einer veränderten amyloidogenen Prozessierung von APP, die zu einer Verschiebung des Verhältnisses von A β_{42} zu A β_{40} in Richtung des schneller aggregierenden A β_{42} führt (Shen u. a., 2007). Auch der stärkste genetische Risikofaktor, das ApoE, deutet auf einen veränderten Haushalt des A β -Peptids hin, da es in Verbindung mit dem Abtransport und der A β -Aggregation steht (Kim u. a., 2009). Kürzlich wurde ein protektiver Effekt einer neu beschriebenen Mutation in APP berichtet, die zu einer Reduktion des amyloidogenen A β -Peptids *in vitro* führt (Jonsson u. a., 2012). Dieses veränderte APP schützt nicht nur vor der

Alzheimerschen Erkrankung, sondern auch vor dem Verlust kognitiver Fähigkeiten beim normalen Altern (De Strooper u. a., 2012).

In einem wesentlichen Teil blieb die ursprüngliche Amyloid-Hypothese kontrovers, da postuliert wurde, dass das A β -Peptid per se neurotoxisch ist (Hardy u. a., 1992). Das A β -Peptid wird jedoch während des normalen APP Metabolismus das ganze Leben mit einer sehr hohen Umsatzrate produziert, was in direktem Widerspruch zu einer inhärenten Toxizität des A β -Peptids steht (Bateman u. a., 2006; Haass u. a., 1992; Seubert u. a., 1992; Shoji u. a., 1992). In Kombination mit dem Befund, dass der Gehalt frei diffundierender A β -Peptide sehr gut mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten bei Alzheimer-Patienten korreliert (Lue u. a., 1999; McLean u. a., 1999; J. Wang u. a., 1999), wurden intermediäre Aggregate des A β -Peptids als primär toxische Molekülspezies identifiziert (Haass u. a., 2007; Hardy u. a., 2002). Eine Reihe von Präparationen dieser A β -Oligomere wurden synthetisch hergestellt, aber auch aus den Gehirnen von Alzheimer-Patienten isoliert (Barghorn u. a., 2005; Bitan u. a., 2003; Gong u. a., 2003; Lambert u. a., 1998; Lesné u. a., 2006, 2013; Shankar u. a., 2008; Walsh u. a., 2002, 1997). Mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen wurde die Toxizität der A β -Oligomere auf die Langzeit-Potenzierung (LTP, long-term potentiation) in hippocampalen Gehirnschnittkulturen in zahlreichen Studien belegt (Haass u. a., 2007). LTP ist eine Form der synaptischen Plastizität, bei der eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung eintritt, die als ein Mechanismus bei Lernen und Gedächtnis postuliert wurde (Bliss u. a., 1993, 1973a,b; Ho u. a., 2011). Aufgrund der Schwierigkeiten A β -Oligomere spezifisch zu detektieren, fehlt jedoch ein direkter Beweis für deren *in vivo* Existenz und deren Lokalisation (Haass, 2010).

Zu der wichtigen Frage, wie A β -Pathologie und Tau-Pathologie molekular verbunden sind, ist bisher relativ wenig bekannt. Interessanterweise gibt es keine genetische Verknüpfung von Mutationen in dem Gen von Tau mit der Alzheimerschen Erkrankung. Mutationen in Tau verursachen eine Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus ohne die extrazellulären Ablagerungen des A β -Peptids (Hutton u. a., 1998; Poorkaj u. a., 1998; Spillantini u. a., 1998). Dies impliziert, dass die Tau-Pathologie per se neurotoxisch ist, aber nicht die A β -Pathologie induzieren kann (Goedert u. a., 2012; Hardy u. a., 2002). Ein Beleg für die umgekehrte Schlussfolgerung wurde in transgenen Mausmodellen gezeigt. Die kombinierte Überexpression von mutierten humanen APP und Tau resultierte in einer verstärkten Tau-Pathologie im Vergleich zur alleinigen Überexpression von Tau (Lewis u. a., 2001). Ein sehr wichtiger

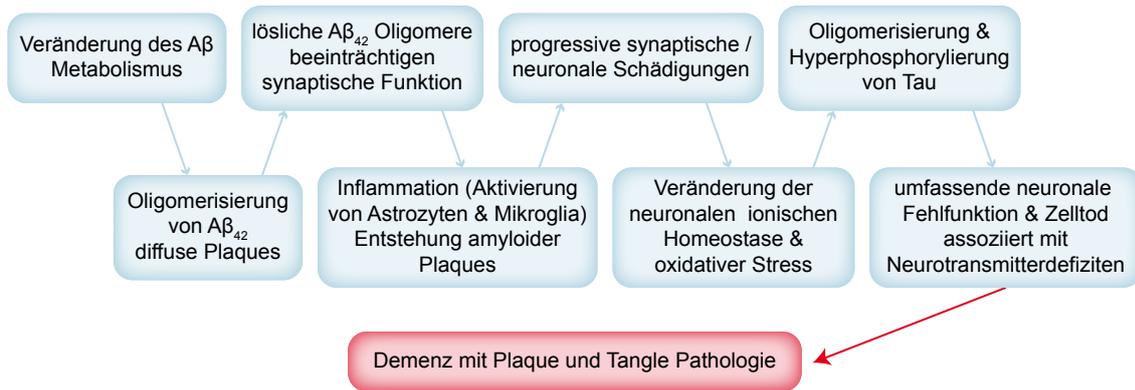


Abb. 1.4: Ablauf der pathologischen Vorgänge beim Morbus Alzheimer nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Die Darstellung basiert auf Hardy u. a. (2002), sowie Haass u. a. (2007).

Beweis für die enge Verknüpfung beider Pathologien wurde in Zellkultur und transgenen Mausmodellen erbracht, bei denen Tau aufgrund eines genetischen Knock-outs nicht exprimiert wurde. In diesen Studien zeigte sich, dass die A β -Toxizität Tau-abhängig ist, da Lerndefizite, LTP-Reduktion und der Verlust von Neuronen in diesen experimentellen Modellen durch den Knock-Out von Tau kompensiert werden konnten (Nussbaum u. a., 2012; Rapoport u. a., 2002; Roberson u. a., 2011, 2007). Dieser Effekt könnte mit der Kinase Fyn zusammenhängen, die über Tau im dendritischen Spine reguliert wird. Eine Änderung der Verteilung von Tau in Richtung des dendritischen Kompartiments, wie bei der Alzheimerschen Erkrankung, kann durch Hyperphosphorylierung von NMDA-Rezeptoren (N-methyl-D-Aspartat) in einem durch toxische Exzitation bedingten Untergang dendritischer Spines resultieren (Ittner u. a., 2011, 2010). Weiterhin wurde eine Verbindung der synaptotoxischen Wirkung von A β -Oligomeren zu Tau über den CAMKK2-AMPK Signalweg (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase, eng.) etabliert, der zur Phosphorylierung von Tau führt (Mairet-Coello u. a., 2013).

Aufgrund der Amyloid-Hypothese wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von therapeutischen Strategien zur Reduktion der A β -Pathologie entwickelt, von denen bisher keine eine Verlaufsverbesserung bei Alzheimer-Patienten gezeigt hat. Für diese negativen Ergebnisse sind zum Teil Nebenwirkungen verantwortlich, als Hauptursache wird aber eine zu späte Behandlung im Stadium der symptomatischen Erkrankung angesehen (Citron, 2010; Selkoe, 2011). Immer mehr Studien deuten darauf hin, dass die molekularen Veränderungen im Gehirn bereits bis zu 25 Jah-

re vor den ersten klinischen Symptomen auftreten (Bateman u. a., 2012; Sperling u. a., 2011). Möglicherweise kann der progressive Verlauf der Krankheit in diesem offensichtlich sehr späten Stadium, bei dem das Gehirn schon substantiellen Schaden genommen hat, nicht mehr gestoppt werden (Selkoe, 2011). Aus diesem Grund müssen neue diagnostische Biomarker zur Früherkennung und der therapeutischen Verlaufskontrolle etabliert werden (Hampel u. a., 2010). Einen ultimativen Test der Amyloid-Hypothese stellen die kürzlich begonnenen Präventionsstudien dar, in denen verschiedene A β -senkende Therapien vor dem Einsetzen der klinischen Symptome in Menschen mit familiären Varianten der Alzheimerschen Krankheit untersucht werden (Callaway, 2012; Garber, 2012; Mullard, 2012; Selkoe, 2012).

1.4 Die Immunisierung als therapeutische Strategie bei Morbus Alzheimer

Die Immunisierung ist eine vielseitige therapeutische Methode, die schon lange und erfolgreich bei verschiedenen Infektionskrankheiten eingesetzt wird. In der modernen Medizin wurden die grundlegenden Strategien der aktiven Immunisierung durch Nutzung monoklonaler Antikörpertechnologie für eine passive Immunisierung erweitert und bei Autoimmunerkrankungen, Krebs und Arteriosklerose zielführend angewendet (Brody u. a., 2008).

Schenk u. a. (1999) berichteten erstmals von einer aktiven Immunisierung mit aggregierten A β_{42} -Peptiden in einem transgenen Mausmodell. Die anschließende Analyse der Mäuse zeigte eine dramatische Reduktion der Plaque-Pathologie, wobei der Effekt unabhängig davon war, ob vor oder nach der Entstehung amyloider Plaques immunisiert wurde. In weiteren Studien wurde der Einfluss auf das Lernverhalten untersucht, das sich ebenfalls sehr stark verbesserte und teilweise sogar das von Wildtyptieren übertraf (Janus u. a., 2000; Morgan u. a., 2000). Mit diesen Versuchen wurde der Grundstein für ein neues, vielversprechendes Feld in der Forschung und Entwicklung von Therapeutika für neurodegenerative Erkrankungen gelegt (Brody u. a., 2008). Die ersten Berichte einer passiven Immunisierung gegen das A β -Peptid zeigten korrespondierende Ergebnisse in der Reduktion der Plaque-Pathologie in transgenen Mausmodellen (Bard u. a., 2000; DeMattos u. a., 2001). In vielen folgenden Studien wurde beobachtet, dass sich die Therapieerfolge in den Lernexperimenten zum Teil sehr schnell einstellten und unabhängig von der Reduktion der Plaque-Pathologie waren (Chen u. a., 2007; Dodart u. a., 2002; Hart-

man u. a., 2005; E. B. Lee u. a., 2006; Oddo u. a., 2006). Eine mögliche Erklärung des Effektes war, dass die toxische Wirkung von diffundierenden A β -Oligomeren für die Lerndefizite verantwortlich war und diese schnell durch die Immunisierung neutralisiert werden konnte (Brody u. a., 2008).

Für die Effekte der Immunisierungen wurden mehrere Mechanismen vorgeschlagen, die sich nicht gegenseitig ausschließen. Mehrere Studien zeigten eine Aktivierung von Mikroglia durch die Immunisierung, wodurch die Phagozytose von amyloiden Plaques stimuliert wurde (Bard u. a., 2000; Schenk u. a., 1999). Dieser Mechanismus bedingt ein Eindringen der Antikörper in das Gehirn, während eine direkte Bindung an amyloide Plaques nicht notwendig war (Citron, 2010). Weiterhin können Antikörper aus aggregiertem A β -Peptid bestehende Amyloidfibrillen *in vitro* direkt auflösen (Frenkel u. a., 2000). Ein kürzlich entwickelter Antikörper, der ausschließlich an amyloide Fibrillen des A β -Peptids bindet, zeigte großes Potential mit diesem Wirkmechanismus (DeMattos u. a., 2012). Zudem ist das Epitop des Antigens für die Bindungscharakteristik des Antikörpers wichtig (Robert u. a., 2012). Antikörper, die gegen die N-terminale Region des A β -Peptids gerichtet sind, binden an jede strukturelle Form des A β -Peptids von Monomeren über Oligomere bis zu amyloiden Fibrillen. Daraus folgt, dass dieses Epitop während jeder Aggregationsstufe exponiert ist (Ida u. a., 1996; Robert u. a., 2010). Dagegen binden Antikörper nur lösliche A β -Monomere, wenn das Epitop in der zentralen Region des A β -Peptids lokalisiert ist. Mit diesen Antikörpern ist ein peripherer Wirkmechanismus assoziiert, bei dem kein Eindringen des Antikörpers in das Gehirn notwendig ist. Sie sequestrieren die A β -Monomere im Blutplasma, wodurch das Äquilibrium des A β -Haushaltes zwischen Gehirn und Blutplasma gestört wird und ein Nettostrom in Richtung Peripherie entsteht (DeMattos u. a., 2001). Ein weiteres Wirkprinzip ist die direkte Bindung von Antikörpern an A β -Oligomere, wodurch deren toxische Effekte neutralisiert werden ohne weitere Auswirkungen auf amyloide Plaques (Citron, 2010). Kürzlich wurde von einem hochspezifischen Antikörper berichtet, der die toxische Wirkung von A β -Oligomeren neutralisiert ohne an monomere A β -Peptide oder fibrilläre A β -Aggregate zu binden (Hillen u. a., 2010). Durch die konformationsspezifische Bindung kann im Vergleich zu einer Immuntherapie gegen das A β -Peptid eine mögliche Interferenz mit dessen physiologischer Funktion vermieden werden (Lemere u. a., 2010).

Aufgrund der aussichtsreichen Erfolge der Immunisierung in Alzheimer-Mausmodellen wurden sehr schnell erste klinische Studien in Alzheimer-Patienten durch-

geführt (Delrieu u. a., 2012). Bei der ersten aktiven Immunisierung mit einem synthetischen A β ₄₂-Peptid traten bei 6 % der Patienten Komplikationen in Form einer Meningoenzephalitis auf, woraufhin die klinische Studie in Phase II abgebrochen wurde (Y.-H. Liu u. a., 2012). Zudem wurde in der Weiterverfolgung der Patienten aus dieser Studie keine Verbesserung im klinischen Verlauf festgestellt (Gilman u. a., 2005; C. Holmes u. a., 2008). Auch die Anwendung der passiven Immunisierung brachte bisher keine Erfolge, den progressiven Verlust der kognitiven Fähigkeiten zu stoppen (Salloway u. a., 2009). Im Jahr 2012 wurden zwei klinische Studien in Phase III mit den bisher am weitesten entwickelten Antikörpern Bapineuzumab und Solanezumab abgebrochen (Mullard, 2012). Weiterhin wurden bei einigen Antikörpern ernsthafte Nebenwirkungen, wie Mikroblutungen und vasogene Ödeme detektiert (Kaufer u. a., 2009; Racke u. a., 2005). Wie bereits im vorherigen Abschnitt 1.3 auf Seite 12 besprochen, wurde die Behandlung in den bisherigen klinischen Studien sehr wahrscheinlich zu spät begonnen (Citron, 2010; Selkoe, 2011). Für die geplanten Präventionsstudien wird die Immunisierung als eine hoffnungsvolle therapeutische Strategie mit angewendet werden (Garber, 2012).

1.5 Intravitaluntersuchungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie

Eine Intravitaluntersuchung hat den Vorteil, dass physiologische und pathophysiologische Vorgänge im intakten Organismus (in drei Raumdimensionen) über die Zeit beobachtet werden können (Pittet u. a., 2011). Da die Zellen als Grundbausteine von Organismen sehr klein sind und nicht direkt vom menschlichen Auge optisch aufgelöst werden können, wurde die Mikroskopie seit Leeuwenhoek zu einem wertvollen Werkzeug in Biologie und Medizin. Lebendes Gewebe eignet sich nicht besonders gut für die direkte optische Untersuchung, wofür die Fluoreszenzmikroskopie als ideale Methodik etabliert wurde. Die Fluoreszenzmarkierung erlaubt die selektive und spezifische Detektion von Molekülen in niedrigen Konzentrationen mit einem hohen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (Yuste, 2005).

Die Intravitaluntersuchung stellt in Abhängigkeit von der Applikation hohe Anforderungen an das zu wählende fluoreszenzmikroskopische Verfahren. In vielen Fällen muss tief im Gewebe mit einer hohen Auflösung, einer möglichst geringen Phototoxizität, hoher Sensitivität und oft auch über mehrere Zeitpunkte mikroskopiert werden. Für viele neurobiologischen Untersuchungen hat sich die Zwei-

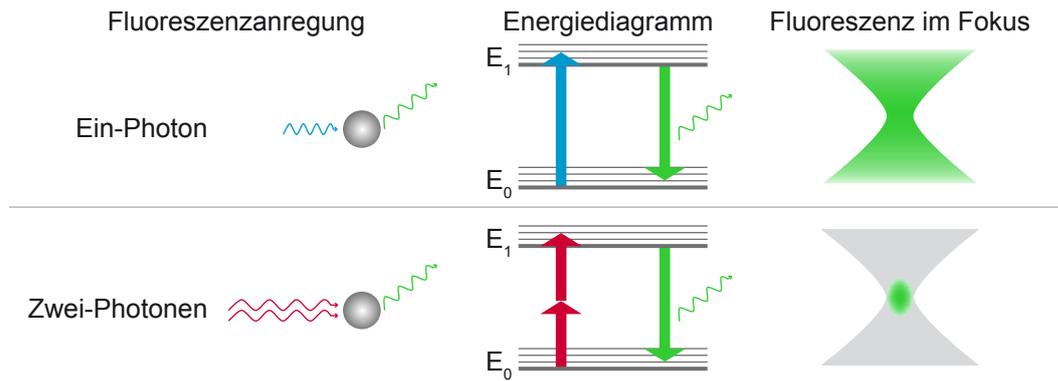


Abb. 1.5: Beschreibung der Fluoreszenzanregung durch ein oder zwei Photonen. Bei der Ein-Photonen-Anregung wird ein Lichtquant (blau) mit der entsprechenden Energie von einem Molekül (graue Kugel) absorbiert, die sich aus der Differenz der Energien des angeregten Niveaus E_1 und des Grundniveaus E_0 im vereinfachten Jablonski-Diagramm ergibt. Im Falle eines Fluoreszenzmoleküls kann ein optischer Übergang in das Grundniveau genutzt werden, wodurch ein Photon mit etwas geringerer Energie als das anregende Photon emittiert wird (grün). Die Ein-Photonen-Anregung findet im gesamten Lichtkegel eines fokussierten Lichtstrahles statt, wie im Schema dargestellt ist. Bei der Zwei-Photonen-Anregung werden zum Überwinden der Energielücke zwischen E_0 und E_1 zwei Lichtquanten (rot) mit halber Energie wie bei der Ein-Photonen-Anregung genutzt. Beide Lichtquanten müssen für diesen nichtlinearen Effekt simultan auf das Molekül treffen, was nur bei sehr hohen Photonendichten möglich ist. Um eine messbare Reaktion zu erreichen, sind Femtosekunden-Laser nötig, die eine entsprechende Photonendichte erzeugen. Die Anregung ist dabei auf das fokale Volumen beschränkt, da nur im Fokus eine ausreichende Photonendichte existiert, wodurch ein inhärenter optischer Schnitt entsteht.

Photonen-Mikroskopie (auch 2P-Mikroskopie) als sehr geeignet erwiesen, die von Denk u. a. (1990) erstmals für biologische Proben demonstriert wurde. Bereits lange vor dieser praktischen Applikation wurde der zugrundeliegende nichtlineare optische Effekt der Zwei-Photonen-Anregung theoretisch von Göppert-Mayer (1931) postuliert. Dieser beruht auf der Existenz einer Wahrscheinlichkeit, dass ein Atom durch Lichtquanten mit geringerer Energie als seiner Anregungsenergie auf ein höheres Energieniveau angeregt werden kann, sofern die Summe dieser Energien gleich der Anregungsenergie ist (Abb. 1.5 auf dieser Seite). Weiterhin müssen beide Photonen simultan auf das Atom oder Molekül treffen, was eine extrem hohe Photonendichte für messbare Ereignisse in absehbaren Zeitdimensionen erfordert. Ein praktischer Vergleich verdeutlicht die extremen Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit mit der Ein-Photonen- und Zwei-Photonen-Anregungen stattfinden. Über ein Ein-Photonen-Ereignis wird ungefähr ein Photon pro Sekunde von einem guten Ein- oder Zwei-Photonen-Absorber bei strahlendem Sonnenschein absorbiert. Bei gleichen Bedingungen findet eine Zwei-Photonenabsorption nur alle 10 Millionen Jahre statt (Denk u. a., 1997).

Die nichtlineare Anregung hat einige Vorteile gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, die besonders wichtig für Intravitaluntersuchungen sind (Svoboda u. a., 2006): (1) Das längerwellige Anregungslicht wird weniger stark von dem Gewebe absorbiert und gestreut, wodurch sich die Eindringtiefe erhöht. Zudem führt eine geringere Absorption zu weniger Phototoxizität. (2) Aufgrund des nichtlinearen optischen Effektes kommt es ausschließlich zur Anregung im fokalen Volumen, was eine inhärente optische Schnittbildung zur Folge hat (Abb. 1.5). Zusätzlich wird dadurch die Phototoxizität weiter verringert und ein Photobleichen der Probe außerhalb des Fokus verhindert. (3) Die Detektionseffizienz in stark streuenden Proben ist wesentlich höher (vor allem tief im Gewebe) im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie. So können auch gestreute Photonen zum Signal beitragen, sofern sie das Objektiv erreichen und passieren. Beim konfokalen Mikroskop werden praktisch keine gestreuten Photonen detektiert, da die als Raumfilter fungierende Lochblende vor dem Detektor diese abblockt. In einem Zwei-Photonen-Mikroskop sind diese Lochblenden vor den Detektoren nicht notwendig, was den optischen Aufbau wesentlich vereinfacht (Abb. 1.6 auf der nächsten Seite). Ein weiterer Unterschied zum konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ist die Anwendung von Ultrakurzpuls-Lasern (meist modengekoppelte Ti:Sa-Laser, 700-1000 nm Wellenlänge) als Anregungslichtquelle, mit denen entsprechende Photonendichten im fokalen Volumen erzeugt werden, damit ein messbares Signal durch Zwei-Photonen-Anregung generiert werden kann (Denk u. a., 1990, 1997).

Für Intravitaluntersuchungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie müssen die zu erforschenden biologischen Strukturen fluoreszieren. Eine Reihe im Gewebe vorkommender Moleküle besitzen eine intrinsische Fluoreszenz, die direkt genutzt werden kann. Intrazelluläre Stoffwechselprodukte, wie NADH (reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid), Flavine oder Indolamine ermöglichen Rückschlüsse auf den Redox-Zustand einer Zelle (Takano u. a., 2007; Zipfel u. a., 2003a,b). Zudem kann die Frequenzverdopplung, ein nichtlinearer optischer Effekt (SHG, second harmonic generation, eng.), zur Kontrastierung von Kollagenfasern, Mikrotubuli und Skelettmuskeln angewendet werden (Zipfel u. a., 2003a). Für kurzzeitige Experimente können synthetische Fluoreszenzfarbstoffe in das Gehirn oder direkt in Zielzellen injiziert werden (Svoboda u. a., 1997). Beispiele sind Oregon Green 488 BAPTA-1 und Sulforhodamin 101, die zur Messung von Calciumsignalen bzw. spezifischen Markierung von Astrozyten verwendet werden können (Garaschuk u. a., 2006; Nimmerjahn u. a., 2004). Eine direkte Injektion von Fluoreszenzfarbstoff in

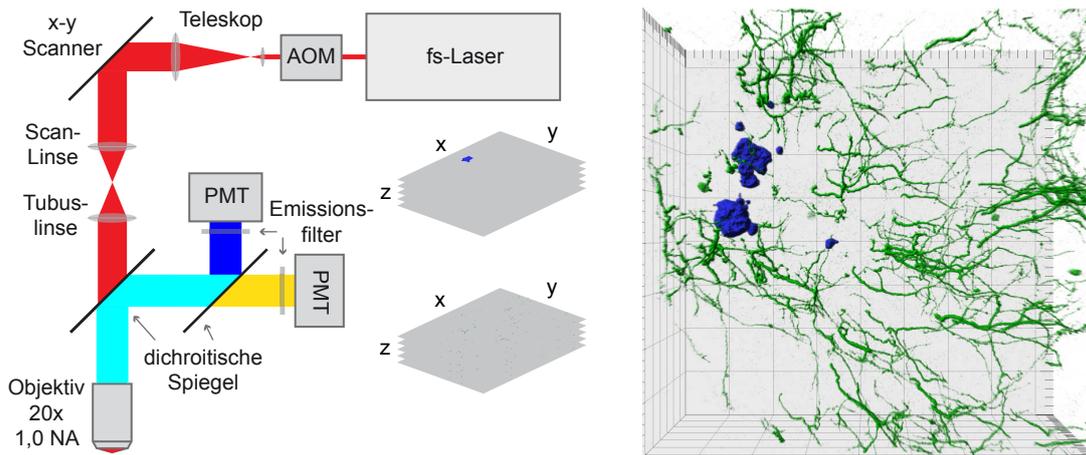


Abb. 1.6: Prinzipieller Aufbau eines Zwei-Photonen-Mikroskopes und die Generation dreidimensionaler Bilder. Für die Zwei-Photonen-Anregung wird meistens ein abstimmbarer Femtosekunden-Laser (fs-Laser) verwendet, dessen emittiertes Licht mit einem Akusto-optischen Modulator (AOM) moduliert wird, um die Anregungsintensität zu kontrollieren (meist modengekoppelte Ti:Sa-Laser, 700-1000 nm Wellenlänge). Der Laserstrahl wird von einem Teleskop aufgeweitet und nach dem Passieren der Scan- und Tubuslinse vom Objektiv in die Probe fokussiert. Durch Deflektion an einem x-y Scanner kann die Position des Fokus in der x-y Ebene verändert und Punkt für Punkt abgescannt werden. Das Anregungslicht und die Fluoreszenzemission werden durch einen dichroitischen Spiegel voneinander getrennt. Mittels weiterer dichroitischer Spiegel wird das Licht auf verschiedene Detektoren verteilt (Photomultipliertubes, PMT), vor denen jeweils ein Emissionsfilter zum Abblocken von restlichem Anregungslicht platziert ist. Mit der inhärenten Bildung eines optischen Schnittes durch die Zwei-Photonen-Anregung in Kombination mit dem x-y Scannen entsteht ein dreidimensionaler Bildstapel. Eine dreidimensionale Rekonstruktion eines solchen Bildstapels ist rechts zu sehen. Die Fluoreszenzen von Methoxy-X04 (blau) und YFP (grün) markieren amyloide Plaques und apikale Dendriten, aufgenommen im Neocortex einer lebenden Maus bis zu einer Tiefe von 300 μm .

das Blutgefäßsystem führt zu einem Angiogramm (Kleinfeld u. a., 1998; Winkler u. a., 2009). Weiterhin können synthetische Fluoreszenzfarbstoffe in Langzeitexperimenten angewendet, sofern sie die Blut-Hirn-Schranke in ausreichenden Mengen passieren können. Die Untersuchung der Proteinaggregation des A β -Peptids in amyloiden Plaques mit Methoxy-X04 im zerebralen Cortex von transgenen Alzheimer-Mausmodellen kann als ein Beispiel angeführt werden (Burgold u. a., 2011; Hefendehl u. a., 2011; Klunk u. a., 2002; Meyer-Luehmann u. a., 2008). In Abbildung 1.7 auf der nächsten Seite ist eine dreidimensionale Aufnahme dargestellt, bei der eine Kombination beider Färbemethoden verwendet wurde.

Als eine sehr elegante Methode vor allem zur Markierung für Langzeituntersuchungen hat sich die Anwendung von fluoreszenten Proteinen, wie z.B. dem grünfluoreszierenden Protein (GFP, green fluorescent protein), erwiesen (Parekh u. a., 2013). Die Entwicklung von spektralen Farbvarianten (XFPs) durch Einfügen von

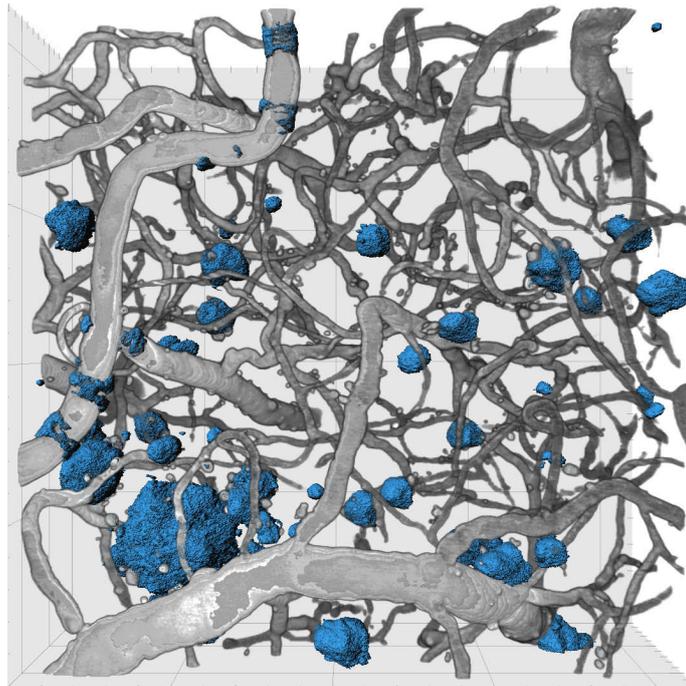


Abb. 1.7: Beispiel eines dreidimensionalen Bildes amyloider Plaques mit einem Angiogramm. Das Bild wurde mittels *in vivo* Zwei-Photonen-Mikroskopie im zerebralen Cortex eines Alzheimer-Mausmodells generiert. Amyloide Plaques (blau) wurden mit Methoxy-X04 und das Blutgefäßsystem (grau) durch eine Injektion von Texas Red®-Dextran in die Schwanzvene angefärbt. Der Maßstab repräsentiert 100 μm .

Punktmutationen hat die Nutzbarkeit zusätzlich gesteigert (Shaner u. a., 2005). Für die *in vivo* Analyse der Neuronenstruktur inklusive dendritischer Spines wurden verschiedene transgene Mauslinien generiert, die XFPs unter der Kontrolle des neurosenspezifischen Promotors Thy-1 exprimieren. In der YFP-H Mauslinie sind Schicht II/III und V Neurone des zerebralen Cortex so spärlich markiert, dass deren Dendritenbaum mit dendritischen Spines sehr gut mikroskopiert werden können, ähnlich einer Golgi-Färbung (Feng u. a., 2000).

Zur *in vivo* Untersuchung des Gehirns mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie muss es optisch zugänglich gemacht werden. In der Literatur sind zwei mögliche Verfahren beschrieben. Bei der „open skull“ Methode wird ein Stück Schädelknochen über der zu untersuchenden Region mit einem Durchmesser von drei bis acht Millimeter entfernt (Fuhrmann u. a., 2007; Holtmaat u. a., 2009; Skoch u. a., 2005; Svoboda u. a., 1997). Im Falle eines Langzeitversuches wird die Öffnung mit einem Deckglas wieder verschlossen, womit ein optisch transparenter und einwandfreier Zugang geschaffen wird, der das Mikroskopieren bis zu einer Tiefe von 700-800 μm erlaubt. Ein

weiterer Vorteil dieser Methode ist der relativ großflächige Ausschnitt des Gehirns, der für die Untersuchung zur Verfügung steht. In Abhängigkeit vom Operateur und weiteren Faktoren (z.B. Einwachsen des Schädelknochens) kann das kraniale Fenster über Wochen und Monate klar bleiben und ermöglicht eine beliebige Anzahl von Mikroskopiezeitpunkten. Aufgrund der invasiven Natur des Eingriffs wird eine Immunreaktion induziert, die nach einer Erholungsphase von zwei bis drei Wochen abgeklungen ist (Holtmaat u. a., 2009). Die „thinned skull“ Methode ist weniger invasiv, da bei der Präparation der Schädel nicht geöffnet wird, sondern durch Bohren bis zu einer minimalen Dicke von 20 μm ausgedünnt wird (Christie u. a., 2001; Grutzendler u. a., 2002; Yang u. a., 2010). Bei dieser Schichtdicke wird der Knochen transparent, allerdings sind die optischen Eigenschaften nicht gleichwertig zum Glasfenster, wodurch nur oberflächliche Aufnahmen möglich sind. Zudem ist die mikroskopierbare Fläche mit einem Durchmesser von 200 μm wesentlich geringer. Für wiederholtes Mikroskopieren mit einem Abstand von mehr als 24 Stunden muss das Fenster erneut präpariert werden, was meist nur drei bis vier Mal gelingt und somit die Gesamtzahl an Zeitpunkten stark einschränkt. Ein Vorteil dieser Methode ist die freie Wahl der Abstände zwischen einzelnen Untersuchungen (Holtmaat u. a., 2009; Yang u. a., 2010). Beide Methoden setzen ein hohes Maß an Erfahrung des Operateurs für ein optimales Ergebnis voraus.

1.6 Strukturelle Plastizität dendritischer Spines

Im Jahr 1888 beschrieb der spanische Arzt Ramón y Cajal eine Serie von kleinen dornenartigen Fortsätzen an den Dendriten von Purkinjezellen im Gehirn eines Huhns, die er als „espinas“ (Spines) bezeichnete (Ramón y Cajal, 1888). Die meisten exzitatorischen Synapsen im erwachsenen Gehirn von Säugetieren enden an dendritischen Spines, wobei ein typischer Spine eine einzelne Synapse an seinem Spine-Kopf lokalisiert hat (Hering u. a., 2001). Dendritische Spines besitzen typischerweise eine Länge zwischen 0,5 und 3 μm und ein Volumen von bis zu 0,8 μm^3 (Harris u. a., 1994). Ultrastrukturelle Aufnahmen zeigten innerhalb des Spine-Kopfes und direkt gegenüber der präsynaptischen, aktiven Zone eine elektronendichte Region, die als postsynaptische Dichte bezeichnet wird (Harris u. a., 1994, 2012). Diese setzt sich aus Strukturproteinen, den Neuro-Transmitter-Rezeptoren und anderen Proteinen zur Signaltransduktion zusammen (Sheng u. a., 2012). Weiterhin enthalten dendritische Spines ein Zytoskelett und optional sind Mitochondrien, Polyribosomen, ein

glattes endoplasmatisches Retikulum und ein „Spine Apparatus“ assoziiert (Hering u. a., 2001). Anhand der Morphologie dendritischer Spines wurden diese in drei Klassen eingeteilt: „thin“ (dünne), „stubby“ (untersetzte) und „mushroom“ (pilzförmige) Spines (Harris u. a., 1992; Peters u. a., 1970). „Mushroom“ Spines besitzen einen relativ großen Kopf, der durch einen dünnen Hals mit dem Dendriten verbunden ist. Im Vergleich dazu weist ein „thin“ Spine einen relativ kleinen Kopf im Verhältnis zur Länge des Spines auf. „Stubby“ Spines kennzeichnet eine annähernd äquivalente Breite wie Länge in Abwesenheit eines Spine-Halses. Zudem müssen noch Filopodien von dendritischen Spines abgegrenzt werden, die Vorstufen von dendritischen Spines vor allem in der postnatalen Entwicklungsphase darstellen (Dailey u. a., 1996; Zuo u. a., 2005a).

Unter dem Begriff der strukturellen Plastizität werden alle Vorgänge zusammengefasst, die mit der kinetischen Änderung von dendritischen Spines assoziiert sind. Diese beinhalten sowohl Modifikationen der Morphologie und Größe, als auch die Neubildung und den Verlust von dendritischen Spines. In *ex vivo* Studien wurde der Einfluss verschiedener Stimuli auf die Größe dendritischer Spines untersucht. Eine hochfrequente Erregung der Präsynapse (LTP-Stimulation) führte zu einer Erhöhung des Spine-Volumens, während eine niederfrequente Erregung (LTD, long-term depression) in einer Verminderung des Spine-Volumens resultierte (Matsuzaki u. a., 2004; Okamoto u. a., 2004; Zhou u. a., 2004). Weiterhin wurde berichtet, dass eine Reduktion der neuronalen Aktivität zum Verlust von dendritischen Spines führen kann (Nägerl u. a., 2004). Der umgekehrte Prozess einer *de novo* Bildung dendritischer Spines wurde dagegen durch eine LTP-Stimulation induziert, die nach 15 bis 19 Stunden alle ultrastrukturellen Merkmale einer synaptischen Verbindung entwickelten (Engert u. a., 1999; Maletic-Savatic u. a., 1999; Nägerl u. a., 2004, 2007). Aufgrund der zeitlichen Stabilität von großen Spines wurde postuliert, dass diese Spines das Gedächtnis repräsentieren. Im Gegensatz dazu könnten die flexiblen, kleinen Spines ein strukturelles Korrelat des Lernens darstellen, die nach Stimulation zu großen Spines des Gedächtnisses transformiert werden (Bourne u. a., 2007; Kasai u. a., 2003).

Die Entwicklung der Intravitaluntersuchung mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie in Kombination mit der Generierung transgener Mauslinien mit einer inhärenten Färbung der neuronalen Strukturen ermöglichte die Langzeitbeobachtung dendritischer Spines in lebenden Mäusen (Grutzendler u. a., 2002; Trachtenberg u. a., 2002). In der postnatalen Entwicklung ist das neuronale Netzwerk sehr dynamisch und die

meisten Spines weisen eine kurze Lebensdauer auf (Holtmaat u. a., 2005; Zuo u. a., 2005a). Unter normalen Bedingungen werden dendritische Spines im adulten Gehirn stabilisiert, mit einem Anteil von bis 70 % stabilen Spines in Abhängigkeit von der untersuchten Gehirnregion (Grutzendler u. a., 2002; Zuo u. a., 2005a). In adulten Mäusen können dendritische Spines neben der Klassifizierung nach der Morphologie, auch zeitlich in transiente und persistente Spines kategorisiert werden. Als transient werden Spines mit einer Lebensdauer von weniger als acht Tagen bezeichnet, während persistente Spines mindestens acht Tage existieren, aber meist über wesentlich längere Zeiträume stabil bleiben (Holtmaat u. a., 2005). Dabei zeigen persistente Spines alle Merkmale einer funktionierende Synapse, während diese bei transienten Spines nicht immer vorhanden ist (Knott u. a., 2006).

Für die Untersuchung der strukturellen Plastizität auf äußere Veränderungen, ähnlich der LTP- und LTD-Stimulation in *ex vivo* Studien, wurden sensorische Manipulationen angewendet, wie das Stutzen der Schnauzhaare, das Verschließen eines Auges oder die Zerstörung einer Retinaregion (Hofer u. a., 2009; Holtmaat u. a., 2006; Keck u. a., 2008; Trachtenberg u. a., 2002; Wilbrecht u. a., 2010; Zuo u. a., 2005b). Durch die Unterdrückung der sensorischen Signale wurde ein massiver Umbau des neuronalen Netzwerkes in den korrespondierenden Gehirnregionen induziert, der durch einen erhöhten Umsatz dendritischer Spines charakterisiert war und dessen strukturellen Veränderungen dauerhaft blieben. Diese Experimente bewiesen die hohe strukturelle Plastizität des Gehirns auch in adulten Mäusen. Als wesentlich physiologischeren Stimulus wurden in neueren Studien verschiedene Lernparadigmen angewendet (Fu u. a., 2011). So führten das Erlernen einer bestimmten Greifübung, das Balancieren auf einem rotierenden Stab und das Erlernen eines Liedes bei einem Zebrafinken zur Ausbildung neuer Spines im motorischen und auditorischen Cortex (Fu u. a., 2012; C. S. W. Lai u. a., 2012; Roberts u. a., 2010; T. Xu u. a., 2009; Yang u. a., 2009). Wiederholtes Training resultierte in einer Stabilisierung neuer Spines, die über Monate stabil bleiben können (T. Xu u. a., 2009). Diese Experimente zeigen, dass dendritische Spines ein physikalisches Korrelat von Lernen und Gedächtnis darstellen und das Lernen mit der Neubildung dendritischer Spines assoziiert ist (Fu u. a., 2011).

Kapitel 2

Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt wird die *in vivo* Analyse der Dichte dendritischer Spines im somatosensorischen Cortex unter dem Einfluß der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) in einem Mausmodell vorgestellt. Die Bildungs- und Wachstumskinetik amyloider Plaques wird detailliert im zweiten Teil beschrieben, und die Auswirkungen einer passiven Immunisierung gegen verschiedene A β -Aggregate auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques und die Synapsendichte in verschiedenen Gehirnregionen werden im dritten Abschnitt dargestellt. Hierbei wird vor allem darauf fokussiert, inwieweit ein hochspezifisch an A β -Oligomere bindender Antikörper im Vergleich zu einem unspezifischen, an verschiedenste A β -Aggregate bindender Antikörper positive Therapieeigenschaften aufweist.

2.1 In vivo Analyse der Dichte dendritischer Spines unter dem Einfluss der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass eine erhöhte Konzentration des A β -Peptides im Gehirn zum Untergang von Synapsen führen kann (Abschnitt 1.3 auf Seite 12). Der Synapsenverlust ist ein charakteristisches Merkmal der Alzheimerischen Erkrankung und sollte in einem Mausmodell *in vivo* untersucht werden, das APP überexprimiert, was zu einer Erhöhung der A β -Konzentration führt (Abschnitt 1.2 auf Seite 8). Dabei wurde der Fokus auf die Untersuchung dendritischer Spines gelegt, die postsynaptische Struktur glutamaterger Synapsen, die besonders stark von der Alzheimer-Pathologie betroffen sind. Diese initiale Charakterisierung sollte die Basis für mögliche *in vivo* Therapiestudien mit verschiedenen Strategien zur Senkung der A β -Konzentration darstellen.

2.1.1 Einführung der verwendeten Mausmodelle

Für die Markierung dendritischer Spines wurde eine Mauslinie verwendet, die das gelbfluoreszierende Protein YFP in einer Subpopulation pyramidalen Neuronen in den Schichten II/III und V des somatosensorischen Cortex exprimiert (YFP-H Mauslinie, Feng u. a. (2000), Abb. 2.1 a auf der nächsten Seite). Das YFP diffundiert im kompletten Neuron und markiert so den gesamten dendritischen Baum inklusive Spines und axonaler Fortsätze. Durch Implantation eines kranialen Fensters über dem somatosensorischen Cortex können dreidimensionale optische Schnittbilder mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie der dendritischen Spines aufgenommen und

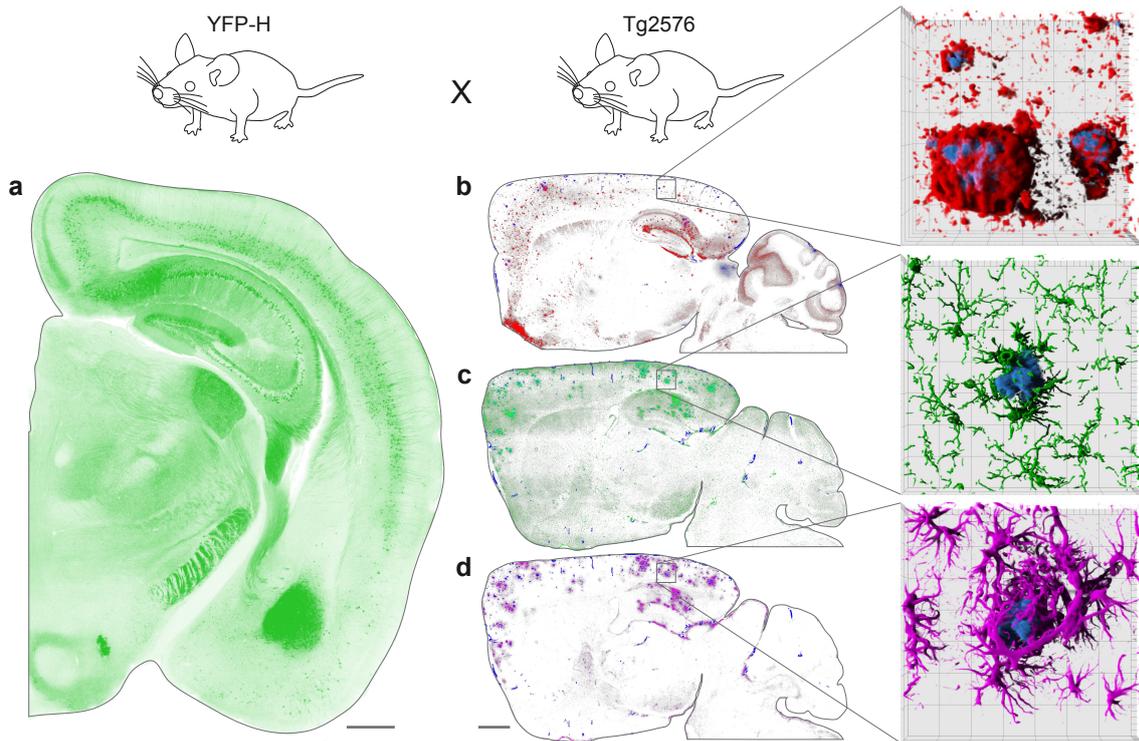


Abb. 2.1: Einführung der verwendeten Mausmodelle. Zur Visualisierung dendritischer Spines wurde eine Mauslinie (YFP-H) ausgewählt, die das gelbfluoreszierende Protein YFP in einem Teil der pyramidalen Neurone in Schicht II/III und V exprimiert. In **a** ist das Expressionsmuster von YFP in einem koronalen Hirnschnitt zu sehen. Diese Maus wurde mit dem Tg2576 Mausmodell gekreuzt, welches das humane Amyloid-Vorläuferprotein mit der familiären schwedischen Mutation unter einem Hamster-Prion-Protein-Promotor exprimiert. Die Überexpression des APP führte hauptsächlich zur Ablagerung des A β -Peptids im zerebralen Cortex und im Hippocampus, wie unter **b** in einem sagittalen Hirnschnitt zu beobachten ist. In rot wurden das Signal einer Antikörperfärbung (Antikörperklon 6E10) gegen das A β -Peptid und in blau die Fluoreszenz des Amyloidfibrillen-bindenden Farbstoffes Methoxy-X04 (ebenso in **c** und **d**) dargestellt. Das vergrößerte, dreidimensionale und Volumen-gerechte Bild zeigt den fibrillären Kern der Plaques in einer Hülle aus niedermolekularen A β -Aggregaten. Die Proteinablagerungen führten zu einer Entzündungsreaktion, indiziert durch eine Erhöhung der Dichte von aktivierten Mikroglia (**c**, Iba1-Färbung, grün) und Astrozyten (**d**, GFAP-Färbung, magenta). In **c** und **d** sind die selben Hirnschnitte zu sehen und die dazugehörigen Vergrößerungen zeigen den selben Plaque. Die Maßstäbe stellen 500 μ m (**a**), 1 mm (**b–d**, Hirnschnitte) und 20 μ m dar (**b–d**, Vergrößerungen).

diese über einen Zeitraum von mehreren Wochen beobachtet werden (Abschnitt 4.2 auf Seite 111). Die YFP-H Maus wurde mit der Tg2576 Mauslinie gekreuzt, die das humane APP mit der schwedischen Mutation unter einem Hamster-Prion-Protein-Promotor exprimiert. Durch die schwedische Mutation in APP kommt es zu einer verstärkten Produktion und Sekretion des A β -Peptids, das durch die sequentielle Spaltung des APP durch die β - und γ -Sekretase entsteht (Haass u. a., 1995). In elf bis 13 Monate alten Tieren sind die Konzentrationen von A β_{40} fünffach und von

A β_{42} 14-fach erhöht im Vergleich zu jüngeren, zwei bis fünf Monate alten Tieren (Hsiao u. a., 1996). Dieser Anstieg der A β -Konzentrationen in alternden Tg2576 Mäusen führt zur Aggregation der A β -Peptide in amyloiden Plaques ab einem Alter von acht bis neun Monaten. In Abbildung 2.1 b auf der vorherigen Seite ist die Verteilung amyloider Plaques in einem sagittalen Gehirnschnitt einer 27,5 Monate alten Tg2576 Maus dargestellt. Die extrazellulären Ablagerungen der A β -Aggregate führen zu einer Immunreaktion in ihrer Umgebung. Diese Immunreaktion ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Dichte von aktivierten Mikroglia (Abb. 2.1 c) und aktivierten Astrozyten (Abb. 2.1 d).

2.1.2 Statische Untersuchung der Dichte dendritischer Spines

In dieser Arbeit sollte die Wirkung einer erhöhten Konzentration von löslichen A β -Molekülen auf die Dichte dendritischer Spines untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die Mäuse in einem Alter von zwölf Monaten untersucht, in dem die A β -Konzentrationen deutlich erhöht sind. Ein Problem stellen die in diesem Alter bereits gebildeten amyloiden Plaques dar. Für zahlreiche Alzheimer-Mausmodelle, inklusive des in dieser Studie verwendeten Modells Tg2576, wurde ein Verlust dendritischer Spines in der Umgebung amyloider Plaques in einer Entfernung von bis zu 50 μm beschrieben (Bittner u. a., 2012, 2010; Grutzendler u. a., 2007; Knafo u. a., 2009; Koffie u. a., 2009; Merino-Serrais u. a., 2011; Spirese u. a., 2005; Spirese-Jones u. a., 2007; Tsai u. a., 2004). Um eine Interferenz dieses Effektes mit der geplanten Untersuchung auszuschließen, wurden die amyloiden Plaques mit dem Fluoreszenzfarbstoff Methoxy-X04 *in vivo* gefärbt (Klunk u. a., 2002). In den Übersichtsbildern wurden nur Dendriten für die hochauflösende Aufnahme zur Detektion der Spines ausgewählt, die einen Mindestabstand von 50 μm zu amyloiden Plaques aufwiesen. Diese Bedingung konnte relativ einfach erfüllt werden, da die Plaquedichte in diesem Alter noch sehr gering war. Aufgrund des anisotropen Auflösungsvermögens von Fluoreszenzmikroskopen im dreidimensionalen Raum wurden die Spinedichten der apikalen Dendriten analysiert, die distal in der Schicht I lagen und hauptsächlich senkrecht zur optischen Achse des Objektivs verliefen (Denk u. a., 1997; Helmchen u. a., 2005). Es wurden Dendriten von Schicht II/III und Schicht V Neuronen untersucht, die durch Zurückverfolgen des Dendritenbaumes von der Oberfläche bis zu einer Tiefe von 450 μm unterschieden werden konnten (Abb. 2.2 a auf der nächsten Seite). Für die apikalen Dendriten der Schicht II/III Neurone wurde kein Unterschied zwischen der Spinedichte von AD-transgenen Tieren und Kontrolltieren de-

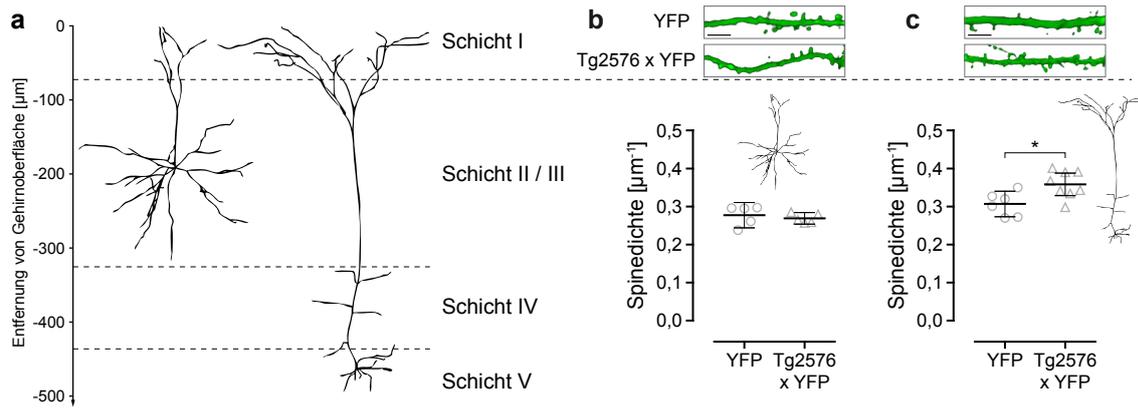


Abb. 2.2: Vergleich der Spinedichten der apikalen Dendriten von pyramidalen Neuronen aus Schicht II/III und V unter dem Einfluss der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins. In **a** sind die Rekonstruktionen von je einem Schicht II/III und Schicht V pyramidalen Neuron zu sehen. Beide Neurone wurden im lebenden somatosensorischen Cortex einer Maus mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie aufgenommen. Die Untersuchung der Spinedichte wurde distal, an den apikalen verzweigten Dendriten in Schicht I in einem Alter von zwölf Monaten durchgeführt. Über den Diagrammen wurden für jede Neuronenart jeweils ein Beispieldendrit für Kontrolltiere (YFP) und AD-transgene Tiere (Tg2576xYFP) als dreidimensionales Volumen-gerendertes Bild gezeigt (grün). Die Spinedichte von Schicht II/III Neuronen unterschied sich nicht zwischen den Kontrolltieren und AD-transgenen Tieren (**b**, YFP/Tg2576xYFP: 1275/1256 μm Dendritenlänge und 363/339 Spines), während für Schicht V Neurone eine signifikante Erhöhung der Spinedichte für AD-transgene Tiere ermittelt wurde (**c**, t-Test, $P=0,016$, YFP/Tg2576xYFP: 2709/2327 μm Dendritenlänge und 831/832 Spines). Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte für einzelne Mäuse. Die Linie und die Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Mittelwerte der Gruppe bzw. das 95 %-Konfidenzintervall. Der Maßstab stellt 5 μm dar. * $P<0,05$

tektiert ($0,28$ und $0,27 \mu\text{m}^{-1}$, Abb. 2.2 b). Im Gegensatz dazu war die Spinedichte von Schicht V Neuronen der AD-transgenen Tiere signifikant erhöht gegenüber den Werten der Kontrolltiere ($0,36$ und $0,31 \mu\text{m}^{-1}$, Abb. 2.2 c). Diese erhöhte Spinedichte unterschied sich ebenfalls signifikant von den Werten der Schicht II/III Neurone, während die Spinedichte der Kontrolltiere unverändert war.

2.1.3 Kinetische Analyse dendritischer Spines

Die erhöhte Spinedichte der apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen unter dem Einfluss der Überexpression von APP sollte detaillierter untersucht werden. Dazu wurden Zeitserien von den selben Dendriten über einen Beobachtungszeitraum von sechs Wochen aufgenommen (Abb. 2.3 auf der nächsten Seite). Eine lineare Regression über die Zeit zeigte keine Änderung der mittleren Spinedichten, da der Anstieg nicht unterschiedlich von Null war (Abb. 2.4 a auf Seite 33). Die Analyse der entsprechenden Achsenabschnitte ergab die gleiche erhöhte Spinedichte ($0,31$ und $0,36 \mu\text{m}^{-1}$) für Dendriten der AD-transgenen Tiere, wie in der

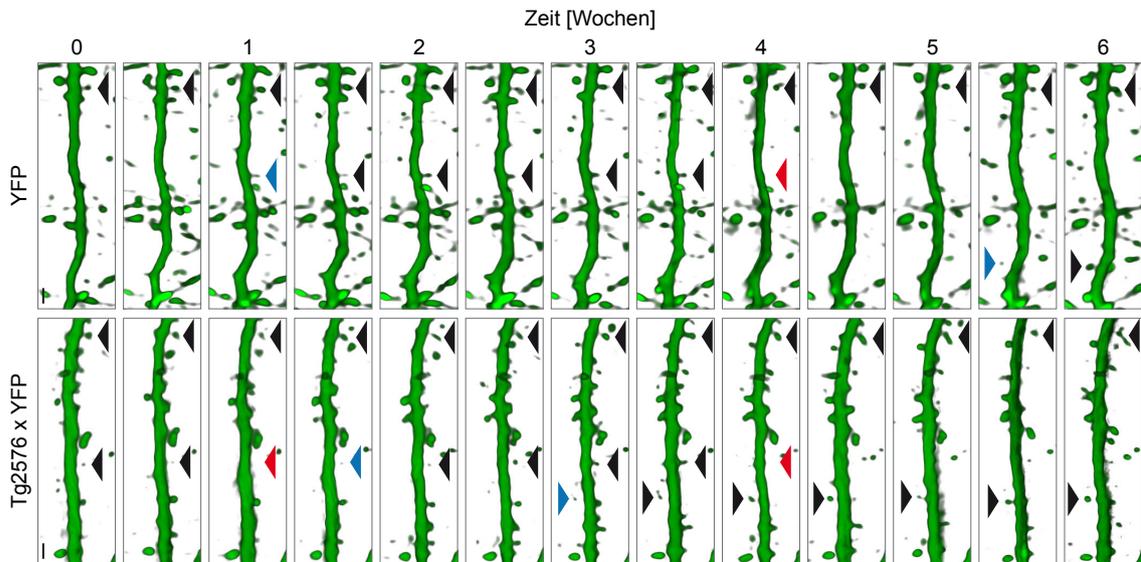


Abb. 2.3: In vivo Zeitserie apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen zur kinetischen Analyse dendritischer Spines über sechs Wochen. Für die kinetische Analyse dendritischer Spines wurde zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von sechs Wochen mikroskopiert. Die beiden Beispieldendriten wurden dreidimensional und Volumen-gerendert in grün dargestellt. Die Symbole zeigen exemplarisch verschiedene kinetische Ereignisse. Der schwarze Pfeil indiziert einen bestehenden Spine, der bereits im vorherigen Zeitpunkt existierte, während die blauen und roten Pfeile neu entstandene bzw. verloren gegangene Spines markieren. Der Maßstab stellt 2 μm dar.

statischen Auswertung. Durch zweimaliges Mikroskopieren innerhalb einer Woche über einen Zeitraum von sechs Wochen konnten einzelne dendritische Spines über die Zeit verfolgt werden (Abb. 2.3 auf dieser Seite). Dabei wurden die kinetischen Ereignisse neu entstehender, verloren gehender und bestehender Spines unterschieden (Pfeile in Abb. 2.3). Die meisten dendritischen Spines im Neocortex sind über lange Zeiträume stabil (Grutzendler u. a., 2002), während ein kleiner Anteil einem ständigen Umsatz unterliegt. Anhand ihrer Lebensdauer können dendritische Spines in transiente, kurzlebige Spines (Lebensdauer <7 d) und persistente langlebige Spines (Lebensdauer ≥ 7 d) unterschieden werden (Holtmaat u. a., 2005). Die erhöhte Spinedichte unter dem Einfluss der Überexpression von APP war auf eine Erhöhung der Dichte persistenter Spines zurückzuführen (Abb. 2.4 b auf der nächsten Seite, 0,24 und 0,31 μm^{-1}). Zwischen beiden Gruppen war die Dichte transienter Spines gleich (0,05 μm^{-1} , Abb. 2.4 b), aber innerhalb der einzelnen Gruppen war die Dichte persistenter Spines stark signifikant erhöht im Vergleich zur Dichte transienter Spines. Die Anteile an neu entstandenen und verlorenen gegangenen Spines über einen Zeitraum von einer Woche waren nicht unterschiedlich, sowohl der Vergleich beider

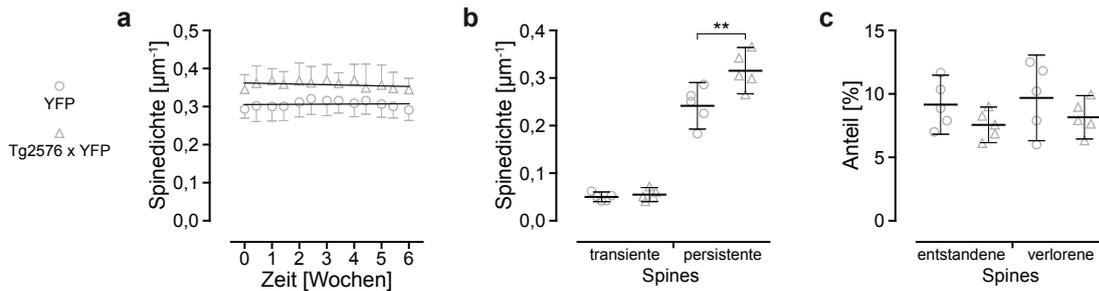


Abb. 2.4: Kinetische Analyse der dendritischen Spines von Schicht V Neuronen. In **a** ist der zeitliche Verlauf der Spinedichte über sechs Wochen zu sehen. Die Symbole stellen die Mittelwerte aus jeweils drei Mäusen dar (YFP/Tg2576xYFP: 442/654 µm Dendritenlänge und 130/223 Spines). Eine lineare Regression der Daten beider Gruppen zeigte, dass sich die Spinedichte nicht über den Beobachtungszeitraum änderte (Anstieg der Regressionsgeraden war nicht signifikant unterschiedlich von Null, F-Test). Ein Vergleich der beiden Achsenabschnitte aus der linearen Regression, was der Spinedichte am ersten Analysezeitpunkt entsprach, ergab einen stark signifikanten Unterschied (F-Test, $P < 0,0001$). Die Unterteilung der dendritischen Spines in kurzlebige transiente Spines (Lebensdauer < 7 d) und langlebige persistente Spines (Lebensdauer ≥ 7 d) ließ eine signifikante Erhöhung der Dichte persistenter Spines von AD-transgenen Mäusen erkennen, während die Dichte transienter Spines unverändert war (**b**, $P < 0,01$). Ein Vergleich der Dichten von persistenten und transienten Spines innerhalb der Gruppen zeigte einen stark signifikanten Unterschied ($P < 0,001$). Die Untersuchung des Umsatzes dendritischer Spines ergab keine Unterschiede für die Anteile neu entstandener und verllorener Spines (**c**). In **b** und **c** stellten die Datenpunkte Mittelwerte einzelner Mäuse dar. Es wurden je fünf Mäuse analysiert (YFP/Tg2576xYFP: 1228/1155 µm Dendritenlänge und 380/420 Spines). Die schwarzen Linien und die Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte der Gruppen bzw. das 95 %-Konfidenzintervall. Als statistischer Test wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test durchgeführt. ** $P < 0,01$

Gruppen als auch der Vergleich innerhalb einer Gruppe (Abb. 2.4 c auf dieser Seite).

2.1.4 Morphologie dendritischer Spines

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung dendritischer Spines stellte die Klassifizierung nach ihrer Morphologie dar. Dendritische Spines unterscheiden sich nach ihrer Größe und Form, wie in Abbildung 2.5 a auf der nächsten Seite zu sehen ist (grüner Volumen-renderter Dendrit). Um die Form und Größe quantifizieren zu können, wurden die apikalen Dendriten der Schicht V Neurone mittels Oberflächen-Rendering dreidimensional rekonstruiert (Abb. 2.5 a; Dendrit: grau; Spines: rot, grün und blau). Dendritische Spines wurden in die drei morphologischen Klassen „thin“, „stubby“ und „mushroom“ nach Harris u. a. (1992); Peters u. a. (1970) eingeteilt (Abb. 2.5 b), deren semiquantitatives Klassifizierungssystem durch mathematische Regeln mit den geometrischen Parametern Spine-Halsdurchmesser, -Kopfdurchmesser, -Länge und -Kopfvolumen interpretiert wurde (Abschnitt 4.4.1 auf Seite 121).

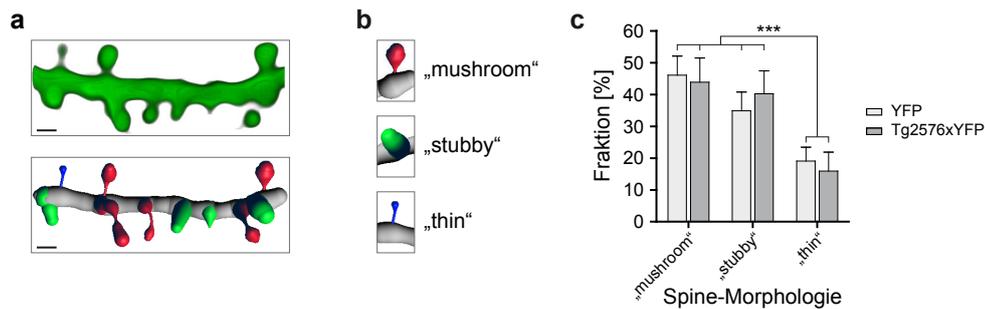


Abb. 2.5: Untersuchung der Morphologie dendritischer Spines von Schicht V Neuronen. Unter **a** ist ein dreidimensionaler Volumen-renderter Dendrit und die Rekonstruktion des Dendriten mit seinen Spines als dreidimensionales Oberflächen-Rendering zu sehen. Der Maßstab repräsentiert 2 μm . Die rekonstruierten Spines wurden nach ihrer morphologischen Klassifizierung farblich unterschieden (**b**). Im Diagramm wurden die Mittelwerte von den Anteilen der verschiedenen Kategorien „mushroom“, „stubby“ und „thin“ mit dem 95%-Konfidenzintervall dargestellt (**c**, YFP/Tg2576xYFP: fünf/sechs Mäuse und 1679/1104 μm Dendritenlänge). Für die statistische Auswertung wurde ein χ^2 -Test durchgeführt mit der folgenden Anzahl an Spines in den Kategorien „mushroom“ 163/117, „stubby“ 123/108 und „thin“ 68/45 (YFP/Tg2576xYFP). Die Quantifizierung der morphologischen Klassen ergab keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (YFP und Tg2576xYFP). Ein Vergleich der Anteile der drei morphologischen Klassen innerhalb der beiden Gruppen YFP und Tg2576xYFP zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen „mushroom“ und „thin“, sowie „stubby“ und „thin“. Als statistischer Test wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test durchgeführt. *** $P < 0,001$

Die Verteilung der drei Klassen war nicht unterschiedlich zwischen beiden Gruppen, aber innerhalb der Gruppen gab es signifikant mehr „mushroom“ und „stubby“ als „thin“ Spines (Abb. 2.5 c).

2.2 In vivo Untersuchung der Entstehungs- und Wachstumskinetik amyloider Plaques in dem Tg2576 Alzheimer-Mausmodell

Im ersten Teil des Abschnittes wurde untersucht, ob das Wachstum amyloider Plaques langsam und stetig fortschreitet oder ob amyloide Plaques über Nacht in ihrer finalen Größe erscheinen und nicht weiter wachsen, wie von Meyer-Luehmann u. a. (2008) postuliert wurde. Anschließend wurde das Wachstum und die Kinetik der Größe und Dichte amyloider Plaques in einem weiteren Experiment detailliert für zwei Altersgruppen untersucht. Diese Daten wurden durch einen Langzeitversuch über 15,5 Monate ergänzt, dessen Dauer beide Altersgruppen mit einschließt.

2.2.1 Nachweis eines longitudinalen und stetigen Wachstums amyloider Plaques über mehrere Wochen

Für eine erste Untersuchung wurden die Übersichtsbilder von der Studie dendritischer Spines in den Tg2576xYFP Mäusen analysiert. Um ein mögliches Plaquewachstum zu detektieren, wurde einmal wöchentlich der Fluoreszenzfarbstoff Methoxy-X04 intraperitoneal injiziert, der an amyloide Plaques bindet. In Abbildung 2.6 auf dieser Seite sind zwei typische Zeitserien über sechs Wochen als Maximumintensitätsprojektionen dargestellt. Es konnten zwei unterschiedliche Arten von Plaques unterschieden werden – neu entstandene Plaques und präexistente Plaques, die bereits beim ersten Zeitpunkt existent waren. Diese beiden Zeitserien ließen bereits ein langsames Wachstum über den Beobachtungszeitraum von sechs Wochen erkennen. Zur genauen Quantifizierung der Plaquegröße wurde das Volumen mittels Oberflächen-Rendering in den dreidimensionalen Bildern bestimmt (siehe Abschnitt 4.4.3 auf Seite 123). Da die Plaquegrößen sehr breit verteilt waren und einer logarithmischen Normalverteilung folgten (Hyman u. a., 1995), wurden die Volumina auf den ersten Zeitpunkt normalisiert, um das Wachstum einzelner Plaques besser vergleichen zu können (Burgold u. a., 2011). Mit den Mittelwerten der normalisierten Volumina konnte eine lineare Regression durchgeführt und das mittlere Wachstum bestimmt werden. Für neu entstandene Plaques wurde nach zwei Wochen und für

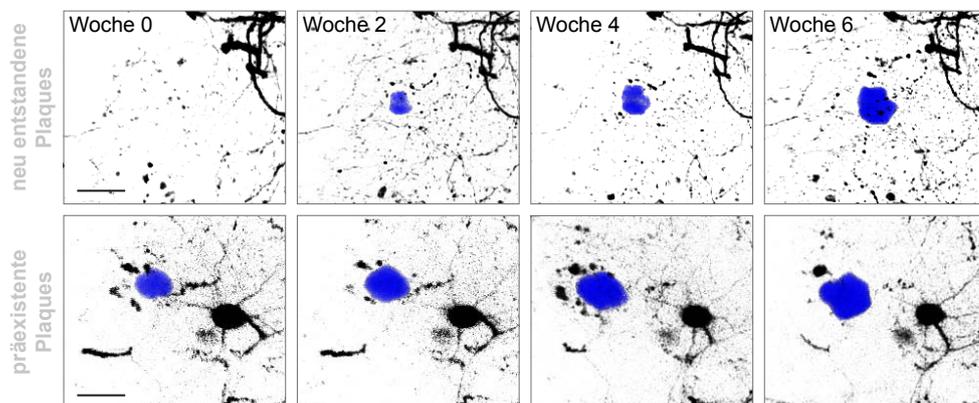


Abb. 2.6: In vivo Zeitserien amyloider Plaques über sechs Wochen. Die Bilder zeigen Maximumintensitätsprojektionen von amyloiden Plaques (Methoxy-X04, blau) und Neuronen mit Neuriten (YFP, schwarz) der *in vivo* Aufnahmen von Tg2576xYFP Mäusen. In der oberen Reihe ist ein neu entstehender Plaque zu sehen, der in Woche zwei zum ersten Mal erschien. Darunter wurde die Serie eines präexistenten Plaques dargestellt, der bereits zum ersten Zeitpunkt vorhanden war. Die Bilder stellten Ausschnitte aus den wesentlich größeren Übersichtsbildern dar. Der Maßstab repräsentiert 20 μm .

2. Ergebnisse

präexistente Plaques bereits nach einer Woche ein signifikantes Wachstum detektiert (Abb. 2.7 a, d auf dieser Seite). Die neu entstandenen Plaques hatten ihr Volumen innerhalb von sechs Wochen ungefähr 18-fach vergrößert, während sich das Volumen der präexistenten Plaques vervierfacht hatte. Eine mögliche Fehlerquelle bei der Quantifizierung der Plaquevolumina war das anisotrope Auflösungsvermögen mit einer schlechteren Auflösung in der z-Achse, aufgrund der in dieser Richtung langgestreckten Punktspreizfunktion des Objektivs (Denk u. a., 1997; Helmchen u. a., 2005). Die damit verbundene z-Streckung der abgebildeten Objekte, könnte zu einer Überbewertung des Plaquewachstums führen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Auswertung der Plaqueflächen in Maximumintensitätsprojektionen durchgeführt, wie sie bereits in mehreren Publikationen angewendet wurde (Christie u. a., 2001; Meyer-Luehmann u. a., 2008; P. Yan u. a., 2009). Die Analyse zeigte

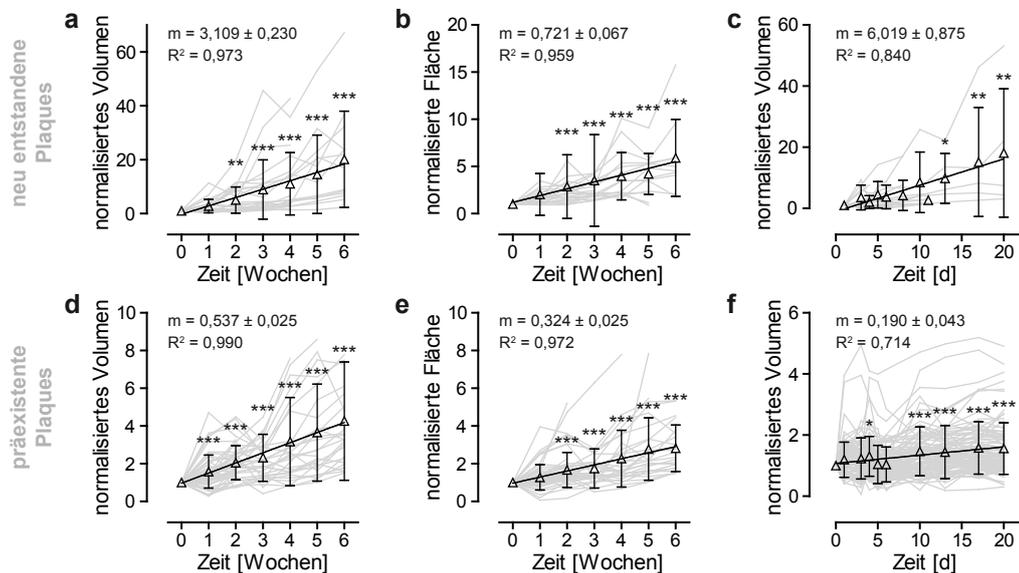


Abb. 2.7: Nachweis des longitudinalen Wachstums amyloider Plaques über mehrere Wochen.

Die Diagramme zeigen die relativen Plaquegrößen über die Zeit normalisiert zum ersten Zeitpunkt. Die Analyse wurde für neu entstandene und präexistente Plaques separat durchgeführt. Die grauen Linien stellen die Verläufe einzelner Plaques dar, während die schwarzen Dreiecke mit den Fehlerbalken die Mittelwerte mit der Standardabweichung repräsentieren. Es wurde für jede Analyse eine lineare Regression durchgeführt und die Anstiege sind als Vielfaches der Größe pro Woche angegeben. Im ersten Versuch wurden die Kinetiken des normalisierten Volumens und der normalisierten Flächen aus Maximumintensitätsprojektionen der dreidimensionalen Bilder von acht Mäusen untersucht (a, b, d und e, 25 neu entstandene und 58 präexistente Plaques). Das Alter der Mäuse zu Beginn des Mikroskopierens betrug zwölf Monate. Im zweiten Versuch wurde der Einfluss auf die Kinetiken des normalisierten Volumens ohne eine dreiwöchige Erholungsphase nach Implantation des kraniellen Fensters getestet (c, f, drei Mäuse, 18 neu entstandene und 115 präexistente Plaques). Die Unterschiede wurden mit einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) in Kombination mit Dunn's Post-hoc-Test ermittelt. * P < 0,05 ** P < 0,01 *** P < 0,001

ein signifikantes Wachstum für neu entstandene und präexistente Plaques nach zwei Wochen (Abb. 2.7 b, e auf der vorherigen Seite). Eine weitere Möglichkeit für eine Erklärung der Diskrepanz zwischen den hier vorgestellten Daten und der Studie von Meyer-Luehmann u. a. (2008) lag in der Zeitspanne zwischen Implantation des kranialen Fensters und dem Start des Mikroskopierens. Um den Versuch von Meyer-Luehmann u. a. (2008) möglichst genau zu replizieren, wurde eine weitere Gruppe von Mäusen analysiert, bei denen anstatt der üblichen drei Wochen Erholungsphase nach der Operation direkt mit dem Mikroskopieren begonnen wurde. Die Auswertung der normalisierten Volumina zeigte ein signifikantes Wachstum erstmals nach 13 Tagen für neu entstandene Plaques und nach vier bzw. zehn Tagen für präexistente Plaques (Abb. 2.7 c, f).

2.2.2 Untersuchung einer möglichen Immunreaktion unter dem kranialen Fenster

Die Implantation eines kranialen Fenster mit Öffnung der Schädeldecke (siehe Abschnitt 4.2.1 auf Seite 111) wurde in der Literatur mit einer Immunreaktion assoziiert (H.-T. Xu u. a., 2007), die zu einer Inhibition des Plaquewachstums führen kann (P. Yan u. a., 2009). Aus diesem Grund wurde die Immunreaktion anhand der Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten quantifiziert, um einen Einfluss unter den vorliegenden Laborbedingungen und der Präparationstechnik des Experimentators innerhalb der Erholungsphase von drei Wochen nach der Operation zu untersuchen. Zur Markierung der Mikroglia wurden heterozygote $CX_3CR1-GFP^{+/-}$ Mäuse verwendet, bei denen ein Allel des Fraktalkinrezeptors CX_3CR1 durch das Gen des grün fluoreszierenden Proteins GFP ersetzt wurde (S. Jung u. a., 2000). Dadurch exprimierten Mikroglia GFP und konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Reaktive Astrozyten wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP, Glial fibrillary acidic protein) in den fixierten koronalen Gehirnschnitten zwei, zehn und 22 Tage nach der Implantation des kranialen Fensters detektiert (Abb. 2.8 a auf der nächsten Seite). Es wurde jeweils die Region direkt unter dem Fenster bis zu einer Tiefe von 500 μm von der Gehirnoberfläche untersucht und mit der korrespondierenden Region in der kontralateralen Hemisphäre verglichen. Die Mikroglia-dichte war zwei Tage nach der Operation unter dem kranialen Fenster signifikant niedriger und zehn Tage danach signifikant höher. Am Ende der Erholungsphase nach 22 Tagen erreichte die Mikroglia-dichte wieder das gleiche Niveau wie in der kontralateralen Hemisphäre (Abb. 2.8 b). Das mittlere

2. Ergebnisse

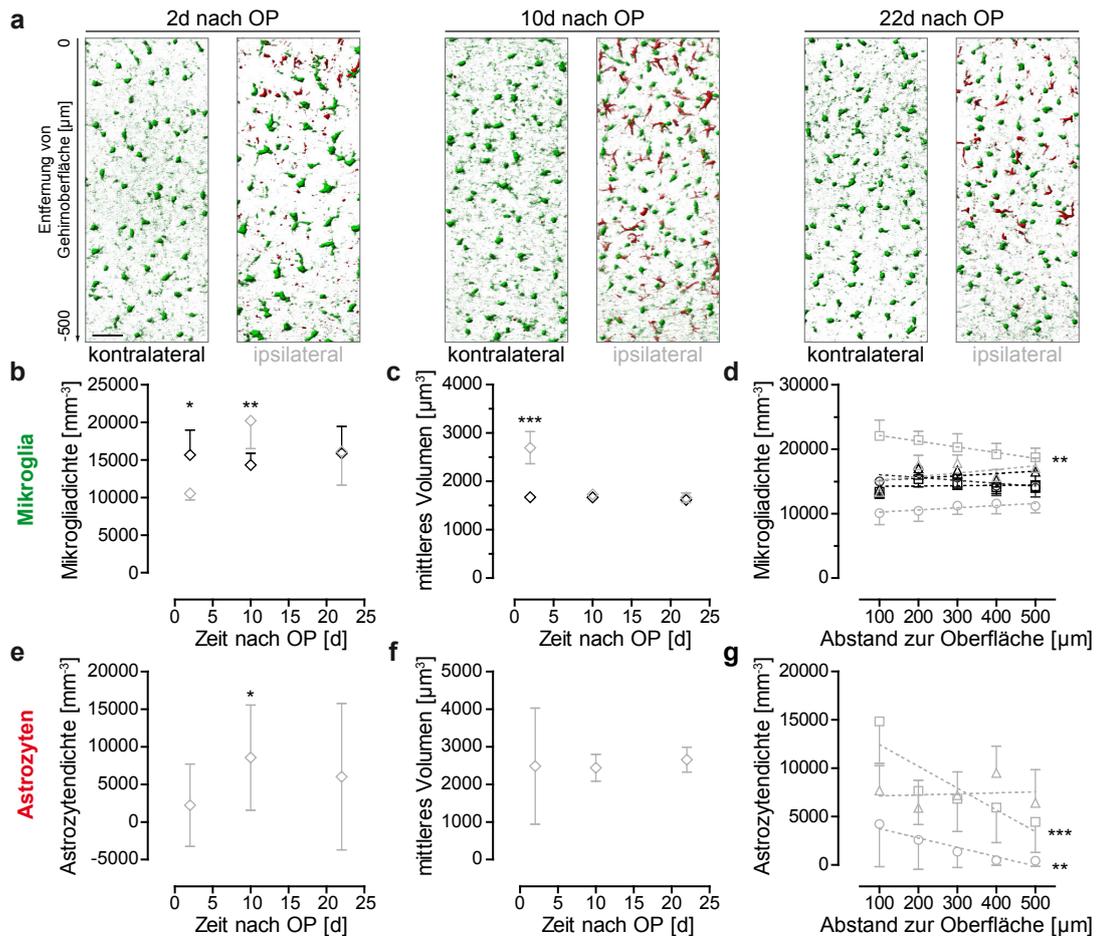


Abb. 2.8: Untersuchung der Aktivierung von Gliazellen nach Implantation eines kranialen Fensters. Für diese Untersuchung wurden heterozygote CX₃CR1-GFP^{+/-} Mäuse verwendet, bei denen ein Allel des Fraktalinerzeptors CX₃CR1 durch das Gen des grün fluoreszierenden Proteins GFP ersetzt wurde. Dadurch exprimierten Mikroglia GFP und konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (a, grün). Reaktive Astrozyten wurden durch Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in den fixierten, koronalen Gehirnschnitten markiert (a, rot). Die Aktivierung der Gliazellen wurde jeweils zwei, zehn (je vier Mäuse) und 22 Tage (drei Mäuse) nach der Implantation des kranialen Fensters (OP) untersucht. Es wurde die Region direkt unter dem Fenster (ipsilateral, grau) bis zu einer Tiefe von 500 µm unter der Gehirnoberfläche mit der korrespondierenden Region in der kontralateralen Hemisphäre (schwarz) verglichen. Die Mikrogliadichte unter dem Fenster war zwei Tage nach OP reduziert und zehn Tage danach erhöht (b). Das mittlere Zellvolumen der Mikroglia war zwei Tage nach OP direkt unter dem Fenster erhöht und danach wieder normalisiert (c). Die Mikrogliadichte wies einen Gradienten mit negativem Anstieg von der Gehirnoberfläche zehn Tage nach OP auf (d, Vierecke). Reaktive Astrozyten wurden ausschließlich ipsilateral zum kranialen Fenster beobachtet. Die Astrozytendichte war nach zehn Tagen signifikant erhöht (e) und das mittlere Zellvolumen war fast identisch zu allen Zeitpunkten (f). Es war ein deutlicher Gradient der Astrozytendichte von der Gehirnoberfläche, zwei und zehn Tage nach OP zu messen. Die Symbole mit Fehlerbalken zeigen die Mittelwerte mit dem 95 %-Konfidenzintervall. Kreise symbolisieren 2 d, Vierecke 10 d und Dreiecke 22 d nach OP. Der Maßstab stellt 50 µm dar. Statistische Tests: einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test (b, c, f), Einstichproben-t-Test gegen Null (e), lineare Regression mit Testung der Ungleichheit des Anstieges von Null mittels F-Test (d, g). * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

Volumen der Mikroglia war zwei Tage nach der Operation signifikant erhöht und erreichte bereits nach zehn Tagen das normale Niveau (Abb. 2.8 c). Eine Betrachtung der Mikroglia-Dichte in Abhängigkeit vom Abstand zur Gehirnoberfläche ergab zehn Tage nach der Operation eine besonders starke Erhöhung der Dichte direkt unter dem Fenster verglichen mit tieferen Regionen. Der Anstieg dieses Gradienten war signifikant unterschiedlich von Null (Abb. 2.8 d auf der vorherigen Seite). Reaktive Astrozyten wurden ausschließlich unter dem implantierten Fenster detektiert (Abb. 2.8 a). Zehn Tage nach der Operation war die Astrozytendichte signifikant unterschiedlich von Null (Abb. 2.8 e). Das mittlere Volumen der Astrozyten änderte sich nicht über den Beobachtungszeitraum von drei Wochen (Abb. 2.8 f). Es war ein deutlicher Gradient der Astrozytendichte von der Gehirnoberfläche zwei und zehn Tage nach der Operation zu messen (Abb. 2.8 g). Am Ende der Erholungsphase war die Astrozytendichte auf einem niedrigeren Niveau und gleichmäßiger in den tieferen kortikalen Schichten verteilt.

2.2.3 Eine detaillierte Darstellung von Plaquedichte, Plaquergröße und Plaquerwachstum

Nach der ersten Bestätigung, dass amyloide Plaques stetig über einen großen Zeitraum wachsen, sollte die Plaquerentstehungs- und Wachstumskinetik detaillierter untersucht werden. Aufgrund der relativ geringen Plaquedichte im Alter von zwölf Monaten wurden in der folgenden Studie sehr große Volumina mikroskopiert, um die Plaquedichte möglichst genau zu messen. Weiterhin sollte durch Messung der Wachstumsraten von einer großen Anzahl amyloider Plaques getestet werden, ob ein Wachstum in älteren Tieren wirklich nicht mehr detektierbar war oder sich lediglich verringerte (Bittner u. a., 2012; Burgold u. a., 2011; Christie u. a., 2001). Für die Realisierung wurde der „TileScan“-Modus des Mikroskopes verwendet, in dem automatisch mehrere Bildfelder des Objektivs mit Hilfe des von der Mikroskopsoftware gesteuerten und motorisierten Tisches direkt aneinander aufgenommen wurden (siehe Abschnitt 4.2.2 auf Seite 112). Es wurden jeweils vier Bildfelder quadratisch angeordnet, sodass mit dem 20x Objektiv eine Region mit der Kantenlänge von 850 μm gescannt wurde. Die Tiefe der Bilder betrug zwischen 300 und 400 μm . In einer Maus wurden mindestens drei solcher großvolumigen Bilder aufgenommen, was dem gesamten untersuchten Volumen der ersten Studie entspricht. Es wurden zwei Altersgruppen von weiblichen Tg2576 Mäusen untersucht, eine junge Gruppe mit zwölf und eine alte Gruppe mit 18 Monaten. Jede Maus wurde mindestens

2. Ergebnisse

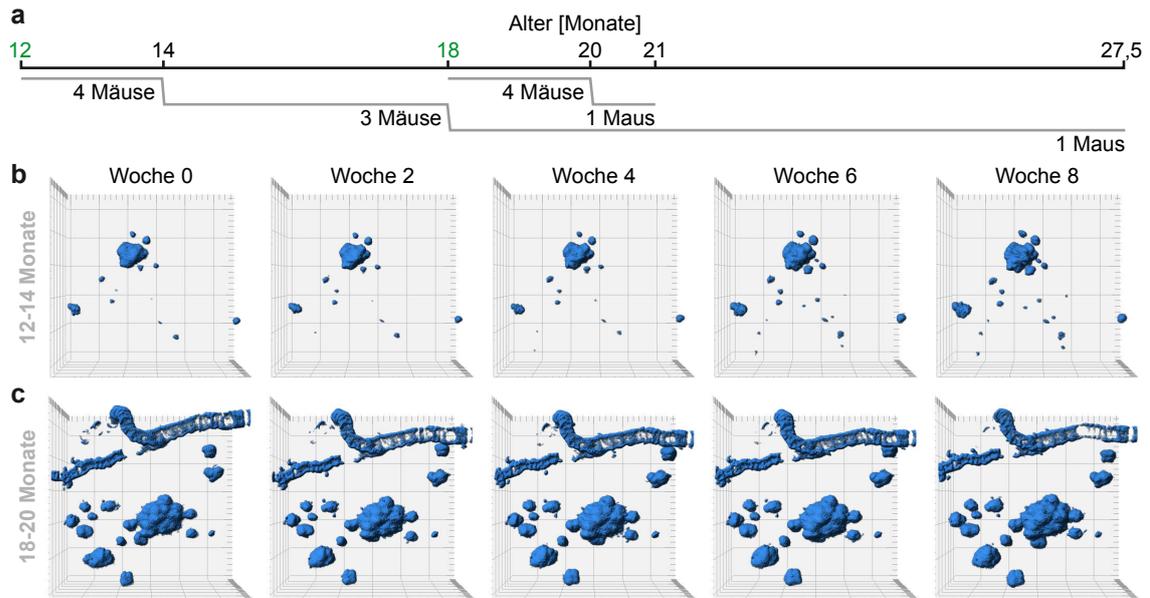


Abb. 2.9: Illustration der Altersgruppen für eine detaillierte Untersuchung der Entstehungs- und Wachstumskinetik amyloider Plaques. Es wurden zwei Gruppen von Tg2576 AD-transgenen Mäusen untersucht, die erste im Alter von zwölf Monaten und die zweite im Alter von 18 Monaten (a, je vier Mäuse). Alle Tiere wurden mindestens zwei Monate einmal pro Woche *in vivo* mikroskopiert. Von der jungen Gruppe konnten drei Tiere über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet werden. Eine dieser Mäuse konnte über einen Zeitraum von 15,5 Monaten untersucht werden. In b und c wurden je eine Zeitserie von *in vivo* Aufnahmen der amyloiden Plaques als dreidimensionale Volumen-gerenderte Bilder dargestellt. Im Beispiel der alten Gruppe war zusätzlich eine zerebrale Amyloidangiopathie zu sehen (c, längliche Struktur), die eine Ablagerung von β -Amyloid in den Blutgefäßwänden darstellt. Es wurden insgesamt folgende Gehirnvolumina untersucht: junge Gruppe $2,888 \text{ mm}^3$, alte Gruppe $3,111 \text{ mm}^3$, zwölf bis 18 Monate $1,076 \text{ mm}^3$ und zwölf bis 27,5 Monate $0,559 \text{ mm}^3$. Der Maßstab repräsentiert $50 \mu\text{m}$.

über einen Zeitraum von zwei Monaten einmal pro Woche *in vivo* mikroskopiert (Abb. 2.9 a auf dieser Seite). Von der jüngeren Gruppe konnten drei Mäuse über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet werden. Eine dieser Mäuse wurde weiter bis zu einem Alter von 27,5 Monaten untersucht. In Abbildung 2.9 sind Zeitserien amyloider Plaques von zwölf bis 14 (b) und 18 bis 20 Monaten (c) als dreidimensionale Volumen-gerenderte Bilder zu sehen. Das Beispiel der alten Gruppe zeigte neben den amyloiden Plaques auch eine zerebrale Amyloidangiopathie, die durch Ablagerungen von β -Amyloid in den Blutgefäßwänden charakterisiert war.

Die mittlere Plaquedichte im Alter von zwölf Monaten war mit 26 mm^{-3} sehr gering und stieg signifikant in den darauffolgenden zwei Monaten auf einen Wert von 42 mm^{-3} an (Abb. 2.10 a auf Seite 42). Der Anstieg der Plaquedichte war auf die 50 neu entstandenen Plaques zurückzuführen, die zu den 101 präexistenten Plaques

hinzukamen. Im Gegensatz dazu wurden nur drei neue Plaques in der alten Gruppe detektiert, die 786 präexistenten Plaques zu Versuchsbeginn mit 18 Monaten gegenüberstanden. Die mittlere Plaquedichte war im Alter von 18 Monaten mit 191 mm^{-3} signifikant höher als mit zwölf oder 14 Monaten (Abb. 2.10 a). Die Plaquedichtekinetik der im Langzeitversuch mikroskopierten Maus (Mittelwert aus zwei Positionen) zeigte einen asymptotischen Verlauf mit einem anfänglich starken Anstieg bis zu einem Plateau im Alter von 24 Monaten (Abb. 2.10 d). Ein Vergleich des Plateaus mit 160 mm^{-3} mit der mittleren Plaquedichte der alten Gruppen dokumentierte keinen signifikanten Unterschied. Die Darstellung der Plaquedichten für jede einzelne mikroskopierte Position aller Gruppen zeigte eine sehr breite Verteilung über mehr als zwei Größenordnungen (Abb. 2.10 d). Es war eine deutliche Überlappung der Verteilungen der Plaquedichten für einzelne mikroskopierte Positionen beider Altersgruppen zu erkennen.

Die Untersuchung der Plaquerößen zeigte ein ähnliches Bild, wie es sich für die Plaquedichten abgezeichnet hatte. Für einen anschaulichen Vergleich wurde der Radius der Plaques aus den Volumina unter der Annahme berechnet, das Plaques annähernd die Form einer Kugel besaßen (Hefendehl u. a., 2011). Den kleinsten mittleren Radius mit $2,3 \mu\text{m}$ wiesen neu entstandene Plaques auf (Abb. 2.10 b auf der nächsten Seite). Diese besaßen auch die schmalste Größenverteilung, die einer Normalverteilung folgte (Abb. 2.10 e). Die präexistenten Plaques im Alter von zwölf Monaten waren im Vergleich mehr als zweimal so groß ($5,1 \mu\text{m}$). Mit steigendem Alter nahmen die mittleren Plaquerößen signifikant zu und erreichten mit 14 Monaten $8,0 \mu\text{m}$, mit 18 Monaten $10,8 \mu\text{m}$ und im Langzeitversuch mit 27 Monaten $16,7 \mu\text{m}$ (Abb. 2.10 b). Die Größenverteilungen der präexistenten Plaques waren sehr breit (zwei Größenordnungen) und folgten einer logarithmischen Normalverteilung. Ein weiterer Vorteil der Berechnung des Kugelradius aus dem Plaquevolumen war die Linearisierung des exponentiellen Wachstums (Abschnitt 4.4.3 auf Seite 123 und Abb. 4.4 auf Seite 124). Dadurch konnte für jeden einzelnen Plaque eine lineare Plaquewachstumsrate als robustes Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit berechnet werden (Hefendehl u. a., 2011).

Die Wachstumsraten der einzelnen Plaques in den verschiedenen Gruppen waren nicht normal verteilt. Aus diesem Grund wurde im Zusammenhang mit Plaquewachstumsraten immer der Median als Mittelwert verwendet. Die höchste mittlere Wachstumsrate wurde mit $0,47 \mu\text{m Woche}^{-1}$ für die neu entstandenen Plaques gemessen (Abb. 2.10 c). Im Vergleich zu diesem Wert waren die mittleren Wachstums-

2. Ergebnisse

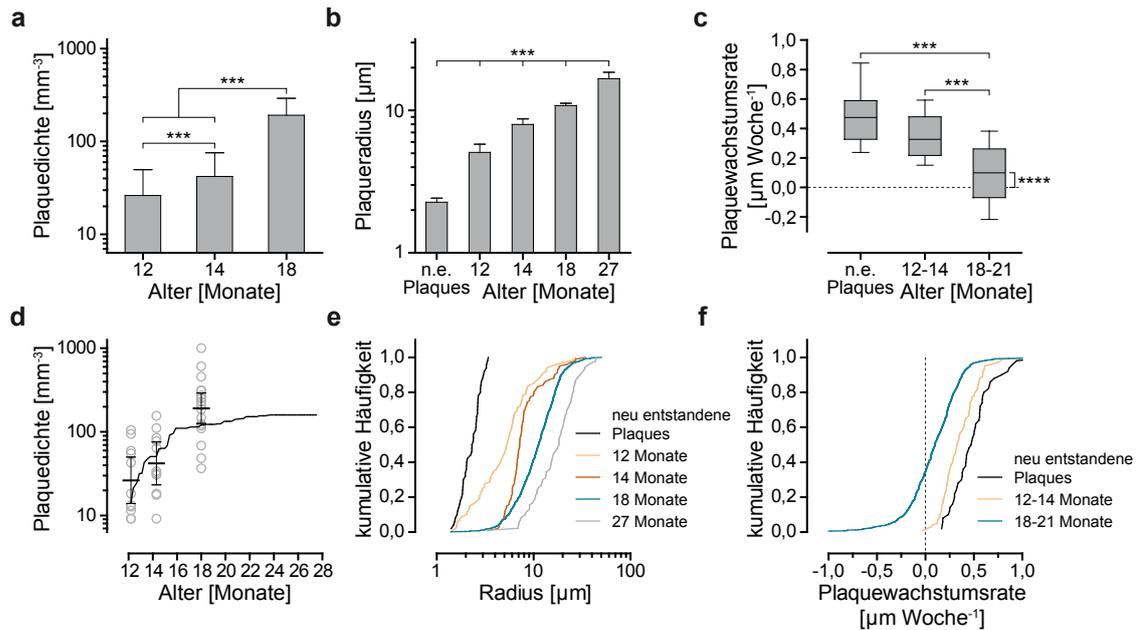


Abb. 2.10: Darstellung der Ergebnisse aus der Untersuchung des Plaquewachstums. In **a** wurden die Plaquedichten für die beiden Altersgruppen dargestellt. Die Plaquedichte war im Alter von 18 Monaten eine Größenordnung höher als mit zwölf Monaten. In der jungen Gruppe war nach acht Wochen Beobachtung ein signifikanter Anstieg der Plaquedichte zu verzeichnen. Der kinetische Verlauf der Plaquedichtezunahme über den Beobachtungszeitraum von 15,5 Monaten ist in **d** zu sehen (schwarze Linie, Mittelwert von zwei Positionen in dieser Maus). Ab einem Alter von 24 Monaten wurden keine weiteren neu entstandenen Plaques detektiert und die Plaquedichte war nahezu identisch mit dem Mittelwert der alten Gruppe (**d**). Zur Einordnung der anderen Altersgruppen wurden die Einzelwerte der Plaquedichte für jede mikroskopierte Position bei zwölf, 14 und 18 Monaten inklusive ihrer Mittelwerte dargestellt. Es war deutlich zu erkennen, dass die Plaquedichte eine sehr breite Verteilung besitzt. Ein Vergleich der Plaqueradien zeigte eine Zunahme der Mittelwerte angefangen von den sehr kleinen neu entstandenen Plaques (n.e.) bis hin zu einem Alter von 27 Monaten (**b**). Die kleinen neu entstandenen Plaques wiesen eine sehr schmale Größenverteilung auf, während für alle präexistente Plaques die Größenverteilung sehr breit war (**e**). Für jeden Plaque wurde aus dem zeitlichen Verlauf des Radius mittels linearer Regression der Anstieg als lineare Wachstumsrate berechnet. Die mittlere lineare Plaquewachstumsrate für neu entstandene Plaques war am höchsten, aber nicht signifikant unterschiedlich zu den präexistenten Plaques im Zeitraum von zwölf bis 14 Monaten. Am langsamsten entwickelten sich die Plaques in der alten Gruppe, deren mittlere Wachstumsrate signifikant niedriger als in allen anderen Gruppen war (**c**, 18 bis 21 Monate). Die linearen Plaquewachstumsraten waren nicht normal verteilt und zeigten ausschließlich positive Werte für neu entstandene Plaques und dem Zeitraum von zwölf bis 14 Monaten (**f**). Das Spektrum an Plaquewachstumsraten war in der alten Gruppe von 18 bis 21 Monaten in den negativen Bereich erweitert und erklärte den Abfall in der mittleren Wachstumsgeschwindigkeit, die signifikant größer Null war ($P < 0,0001$). Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall (**a**, **b**, **d**) oder die 10. bzw. 90. Perzentile (**c**). Im Boxplot wurden der Median mit dem Interquartilsabstand dargestellt (**c**). Es wurden folgende Anzahlen an amyloiden Plaques untersucht: 50 neu entstandene und 101 präexistente Plaques von zwölf bis 14 Monate, 786 Plaques von 18 bis 21 Monate und 90 Plaques von zwölf bis 27,5 Monate. Statistische Tests: einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test (**a**, **b**), t-Test für gepaarte Proben (**a**, Vergleich zwölf mit 14 Monaten), Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test (**c**). Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test gegen Null (**c**, 18 bis 21 Monate). *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$

raten der präexistenten Plaques von der jungen Altersgruppe mit $0,33 \mu\text{m Woche}^{-1}$ etwas niedriger, aber unterschieden sich nicht signifikant. Die mit Abstand geringste mittlere Plaquewachstumsrate wurde mit $0,10 \mu\text{m Woche}^{-1}$ für die alte Gruppe von 18 bis 21 Monaten gemessen. Diese unterschied sich signifikant von Null, d. h. ein Nettowachstum war vorhanden. Ein Blick auf die Verteilungen der Plaquewachstumsraten zeigte, dass praktisch jeder neu entstandene oder präexistente Plaque aus der jungen Altersgruppe ein positives Wachstum aufwies (Abb. 2.10 f). Interessanterweise waren die Breiten der Verteilungen dieser beiden Gruppen nahezu gleich und die Verteilung der neu entstandenen Plaques war leicht in Richtung schnellerer Wachstumsraten parallel verschoben. Die Verteilung der Plaquewachstumsraten der alten Gruppe war deutlich in den Bereich negativer Wachstumsraten erweitert, was die deutlich niedrigere mittlere Plaquewachstumsrate erklärte.

2.2.4 In vivo Wachstum amyloider Plaques in einem Zeitraum von 15 Monaten

Nach der Darstellung der Messdaten zur Plaquedichte, der Plaquegröße und der Plaquewachstumsrate für die junge und alte Untersuchungsgruppe, wird im folgenden der Fokus auf die Daten aus den Langzeitversuchen gelegt. Diese nahmen eine besondere Rolle ein, da der Beobachtungszeitraum im Falle der 15-monatigen Untersuchung beide Altersgruppen bei Weitem überspannte, während die sechsmonatigen Untersuchungen zumindest beide Altersgruppen zeitlich verbanden (siehe Abb. 2.9 a auf Seite 40). In Abbildung 2.11 a auf der nächsten Seite wurde eine Zeitserie in Form von dreidimensionalen Volumen-gereinigten Bildern von 12,2 bis 26,5 Monate dargestellt. Die Zeitserie zeigte die Veränderungen in einem Abstand von ungefähr drei Monaten im kompletten, an dieser Position mikroskopierten Volumen ($0,254 \text{ mm}^3$). Zu Beginn des Experimentes waren lediglich vier Plaques vorhanden, deren Anzahl mit zunehmendem Alter kontinuierlich anstieg, bis keine weiteren neuen Plaques entstanden waren. Die Abstände und Positionen zwischen den vier präexistenten Plaques – und auch neu entstandenen Plaques – blieben über die Zeit gleich, sodass diese immer als Referenz zur Positionierung des Bildfeldes in jeder Mikroskopiesitzung verwendet werden konnten. Dadurch war das Nachverfolgen der individuellen Plaques über die Zeit möglich und ein immenser Anstieg der Plaquegrößen wurde deutlich. Zusätzlich war in dem Beispiel die Entwicklung einer zerebralen Amyloidangiopathie zu beobachten, welche die länglichen Strukturen darstellten. Der visuelle Eindruck des Anstiegs der Plaquegröße wurde durch die quantitative Aus-

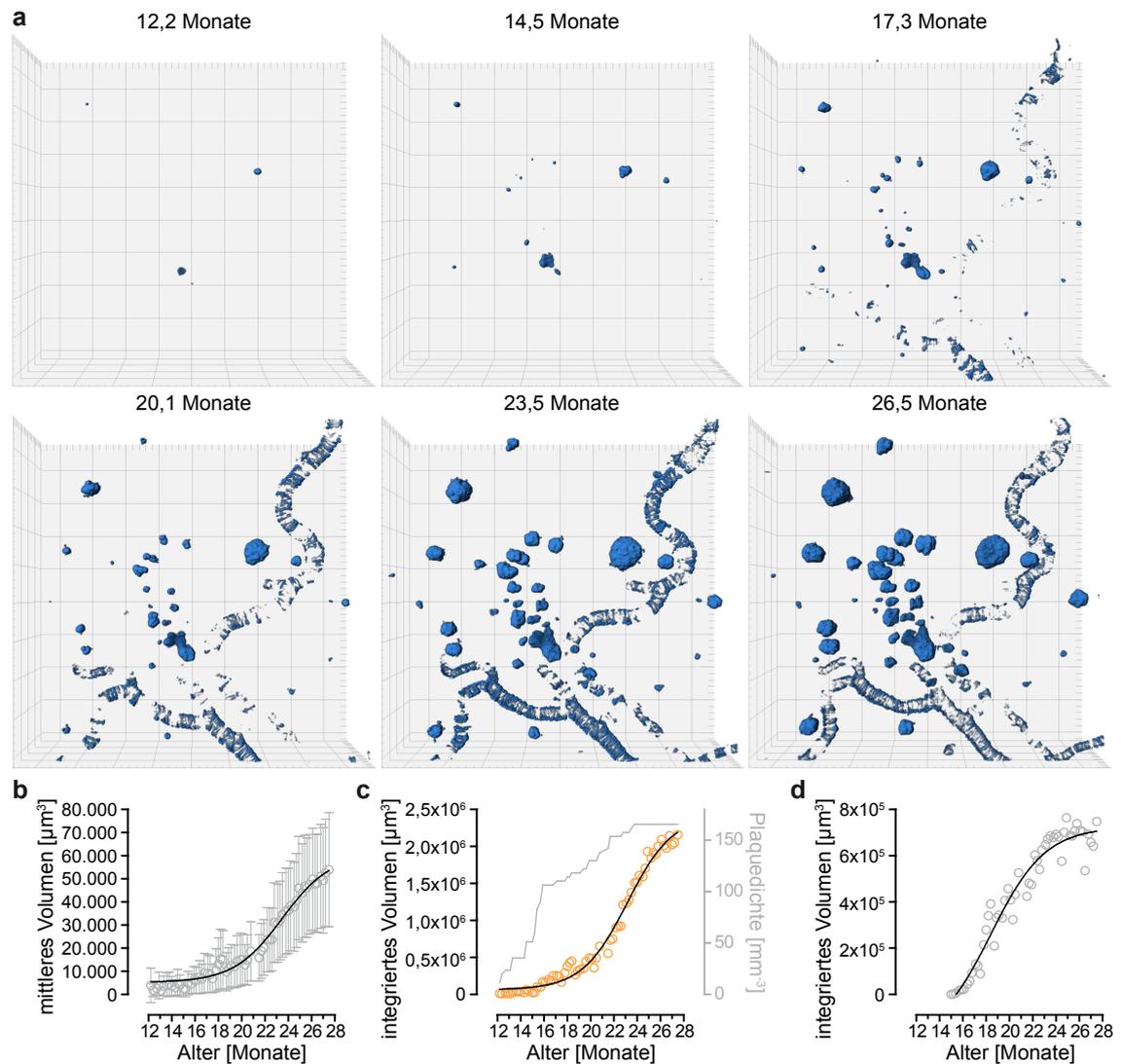


Abb. 2.11: Darstellung eines Beispiels für die Langzeituntersuchung der Plaquewachstumskinetik über 15,5 Monate. In **a** ist eine Zeitserie dreidimensionaler Volumen-gerendeter Bilder von amyloiden Plaques und zerebraler Amyloidangiopathie zu sehen. Die Bilder zeigten das komplette Volumen der im „TileScan“-Modus aufgenommenen Position. In diesem Modus wurden, mit dem von der Mikroskopsoftware gesteuerten Objektisch, automatisch mehrere Positionen angefahren, sodass die aufgenommenen z-Stapel direkt aneinander grenzten. Das mittlere Volumen (Kreise) aller Plaques über die Zeit wurden für dieses Beispiels im Diagramm unter **b** dargestellt (Fehlerbalken repräsentieren 95 %-Konfidenzintervall). Die schwarze Linie zeigt die nichtlineare Regression einer Sigmoid-Funktion. Unter **c** wurden das integrierte Volumen aller Plaques inklusive Regression (Kreise und schwarze Linie) und die Plaque-dichte (graue Linie) über die Zeit gezeigt. Die Kinetik des integrierten Volumens der zerebralen Amyloidangiopathie wurde unter **d** dargestellt. Der Maßstab repräsentiert $100 \mu\text{m}$ (Quadrate).

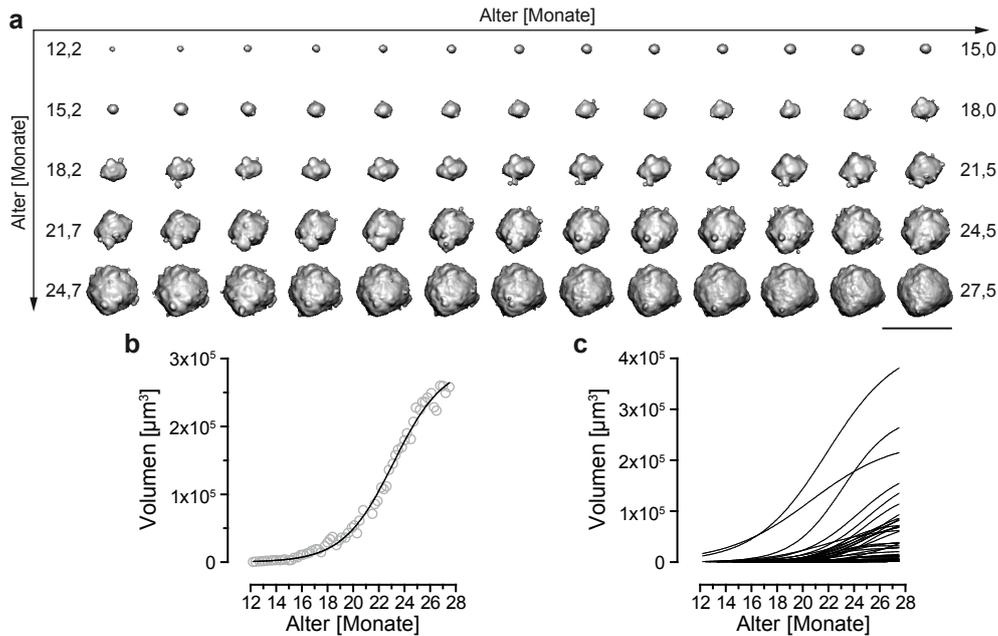


Abb. 2.12: Darstellung der Kinetik eines Plaques über den Zeitraum von 15,5 Monaten. In a ist die Entwicklung eines Plaques als dreidimensionales Oberflächen-gerendertes Objekt über den gesamten Beobachtungszeitraum von 15,5 Monaten zu sehen. Das Volumen über die Zeit wurde im Diagramm in b dargestellt. Die schwarze Linie zeigt das Ergebnis der Regression einer Sigmoid-Funktion ($R^2=0,993$). Die Regressionen der Volumina über die Zeit aller Plaques dieser Position sind im Diagramm unter c zu sehen. Der Maßstab repräsentiert 100 µm.

wertung der Plaquevolumina bestätigt (Abb. 2.11 b). Das mittlere Volumen stieg stetig an und der Verlauf war durch eine exponentielle Phase gekennzeichnet, auf die eine asymptotische Phase folgte. An die Daten konnte durch nichtlineare Regression eine Sigmoid-Funktion angepasst werden. Das Gleiche galt für das integrierte Plaquevolumen, wie in Abbildung 2.11 c dargestellt wurde. Eine gleichzeitige Betrachtung der Plaquedichtekinetik zeigte, dass die meisten neuen Plaques in der exponentiellen Phase entstanden, einige wenige in der Übergangsphase und keine in der asymptotischen Phase. Das integrierte Volumen der Amyloidangiopathie wies nur eine sehr kurze exponentielle Phase auf, mit einer anschließenden langen und linear wirkenden Übergangsphase, gefolgt von einer asymptotischen Phase (Abb. 2.11 d). Auch hier konnte eine Sigmoid-Funktion angepasst werden.

In Abbildung 2.12 auf dieser Seite ist die komplette Zeitserie eines individuellen Plaques als dreidimensionales Oberflächen-gerendertes Objekt zu sehen (Plaque links oben im Bild des ersten Zeitpunktes in Abb. 2.11 a). Die Kinetik des Volumens zeigte den gleichen Sigmoid-förmigen Verlauf wie das mittlere und integrierte

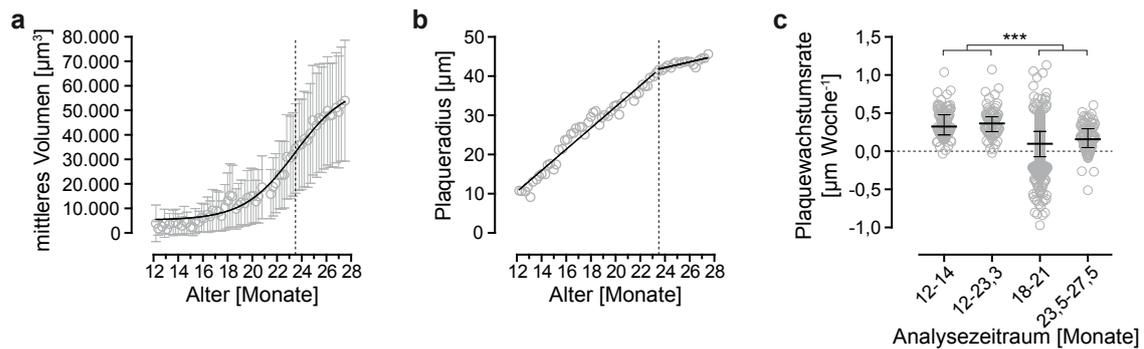


Abb. 2.13: Differenzierte Analyse der Plaquewachstumsgeschwindigkeit der Daten aus dem Langzeitversuch über 15,5 Monate. In **a** wurde das mittlere Plaquevolumen über die Zeit dargestellt (entspricht Abb. 2.11 b auf Seite 44). Die schwarze Linie zeigt die Regression einer Sigmoid-Funktion. Durch den Wendepunkt der Sigmoid-Funktion bei ungefähr 23,5 Monaten wurden die exponentielle und asymptotische Phase der Kurve voneinander getrennt (gestrichelte Linie). Dementsprechend wurde eine differenzierte Analyse der linearen Wachstumsraten für die exponentielle Phase von zwölf bis 23,5 Monate und für die asymptotische Phase von 23,5 bis 27,5 Monate durchgeführt. Ein Beispiel für diese Analyse wurde unter **b** dargestellt. Anhand der beiden linearen Regressionen (schwarze Linien) war deutlich zu erkennen, dass der mittlere Radius (Kreise) schneller in der exponentiellen Phase wuchs. Das Ergebnis der kompletten Analyse aller Plaques zeigte eine signifikant niedrigere mittlere Wachstumsrate im Zeitraum von 23,5 bis 27,5 Monaten als von zwölf bis 23,5 Monaten (**c**). Zum Vergleich wurden die Daten der jungen (zwölf bis 14 Monate) und alten (18 bis 21 Monate) Altersgruppe (aus Abb. 2.10 c auf Seite 42) dargestellt. Die mittleren Wachstumsraten der jungen und alten Gruppe waren fast identisch mit den jeweiligen mittleren Wachstumsraten der exponentiellen bzw. asymptotischen Phase aus dem Langzeitversuch. Die Kreise stellen die Werte einzelner Plaques dar, während die schwarzen Linien mit den Fehlerbalken die Mediane mit den Interquartilsabständen repräsentieren (**c**). Es wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test auf statistische Unterschiede getestet. *** $P < 0,001$

Volumen der Gesamtheit aller vermessenen Plaques. Eine Darstellung jeder einzelnen, an die Daten angepassten Sigmoid-Funktionen der Plaques aus dem Beispiel von Abbildung 2.11 verdeutlichte, dass nur sehr wenige Plaques sehr groß wurden ($>100.000 \mu\text{m}^3$) und die meisten Plaques eine flachere Wachstumskurve aufwiesen. Diese quantitative Beschreibung bestätigte den visuellen Eindruck aus den Übersichtsbildern (Abb. 2.11 a auf Seite 44).

Das Langzeitwachstum der amyloiden Plaques legte eine differenzierte Analyse des Wachstums nahe, entsprechend der exponentiellen und asymptotischen Wachstumsphase. Als Zeitpunkt für die Unterscheidung beider Phasen wurde der Wendepunkt der an die mittleren Plaquevolumina angepassten Sigmoid-Funktion ausgewählt (Abb. 2.13 a auf dieser Seite). Dementsprechend wurden für jeden Plaque die linearen Wachstumsraten einmal im Zeitraum von zwölf bis 23,5 Monaten und von 23,5 bis 27,5 Monaten bestimmt, was der exponentiellen und asymptotischen Phase entsprach. In Abbildung 2.13 b ist ein Beispiel für die differenzierte Analyse

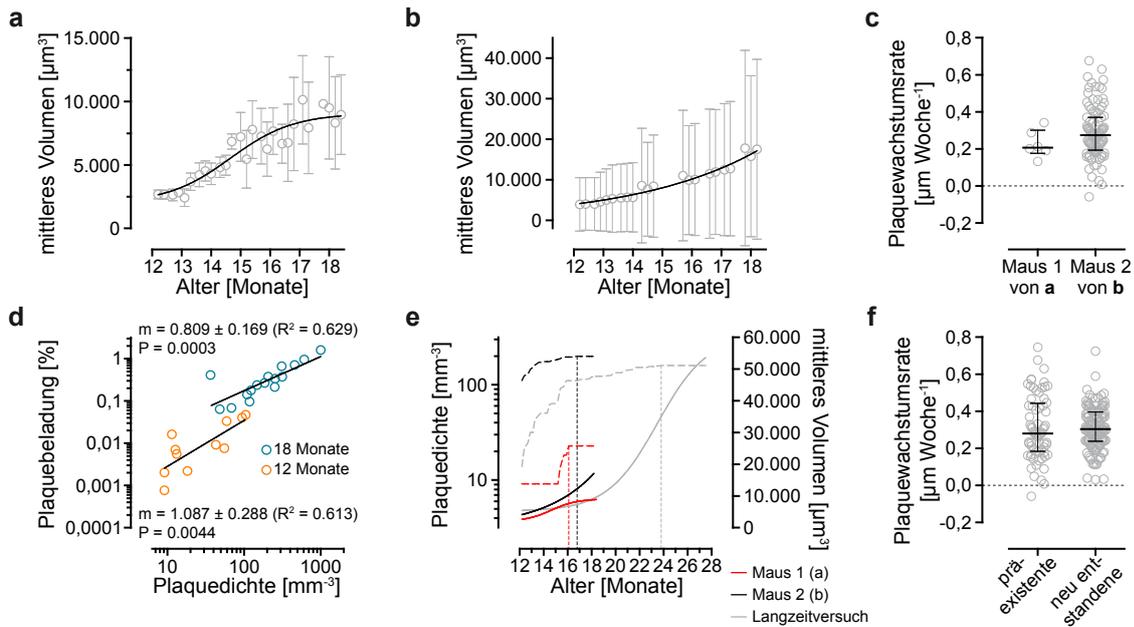


Abb. 2.14: Untersuchung des Plaquewachstums im Alter von zwölf bis 18 Monaten. Zwei Mäuse aus der jungen Gruppe konnten sechs Monate mikroskopiert werden. Die Kinetiken der mittleren Volumina zeigten im Fall von Maus 1 (a) eine Stagnation des Wachstums bereits vor 18 Monaten, während sich das Wachstum bei Maus 2 (b) immer noch in der exponentiellen Phase befand. Zu den jeweiligen Kinetiken wurden die nichtlinearen Regressionen berechnet und als schwarze Linien dargestellt. Die linearen Wachstumsraten der einzelnen Plaques, symbolisiert durch Kreise, sind in c zu sehen (sechs und 95 Plaques). Ihre Mediane unterschieden sich nicht signifikant. Die Plaqueladung im Gehirn (integriertes Plaquevolumen/Gehirnvolumen) korrelierte mit der jeweiligen Plaquedichte (d). Daher konnte die Plaquedichte als indirekter Prädiktor der A β -Konzentration im Gehirn verwendet werden, da diese mit der Plaqueladung korrelierte (Cirrito u. a., 2003; DeMattos u. a., 2002a). Um die Daten der beiden Mäuse im Vergleich zu dem Langzeitversuch über 15,5 Monate zu setzen, wurden die nichtlinearen Regressionen der mittleren Volumina der drei Mäuse im Diagramm unter e dargestellt. Zusätzlich wurden die Kinetiken der Plaquedichten als gestrichelte Linien gezeigt. Die senkrechten gestrichelten Linien indizieren die Zeitpunkte, ab denen keine neuen Plaques in den jeweiligen Mäusen entstanden waren. Im Diagramm in f wurden die Plaquewachstumsraten aller Plaques dargestellt, die über mindestens sechs Monate beobachtet wurden (drei Mäuse, 68 präexistente und 123 neu entstandene Plaques). Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen (schwarze Linien) der Plaquewachstumsraten der neu entstandenen und präexistenten Plaques festzustellen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (a), das 95%-Konfidenzintervall (b) oder die Interquartilsabstände (c, f). Statistische Unterschiede wurden mit einem Mann-Whitney-Test (c, f) oder F-Test (d) geprüft.

für einen Plaque gegeben, in dem der Radius über die Zeit mit einer linearen Regression über die beiden Zeitbereiche gezeigt wird. Diese Darstellung visualisierte sehr deutlich, dass das anfänglich starke Wachstum über den sehr langen Zeitraum von elf Monaten gegenüber dem langsameren Wachstum über vier Monate am Ende dominierte. Der visuelle Eindruck wurde durch die quantitative Analyse bestätigt, in der ein signifikanter Unterschied zwischen dem Mittelwert der Wachstumsraten bei

einer linearen Regression von zwölf bis 23,5 und 23,5 bis 27,5 Monaten festzustellen war ($0,37$ und $0,16 \mu\text{m Woche}^{-1}$, Abb. 2.13 c). Zwischen den mittleren Wachstumsraten aus der Analyse der exponentiellen und asymptotischen Phase bestand der gleiche signifikante Unterschied, wie er zwischen der jungen und alten Gruppe ($0,33$ und $0,10 \mu\text{m Woche}^{-1}$) detektiert wurde (Abb. 2.13 c).

Im Verlauf des Versuches konnten zwei weitere Mäuse über einen längeren Zeitraum von sechs Monaten mikroskopiert werden. Diese beiden Datensätze stellten daher ein Bindeglied zwischen der jungen und alten Gruppe dar. In Abbildung 2.14 a und b auf der vorherigen Seite wurden die Kinetiken der mittleren Volumina abgebildet. Das Wachstum der mittleren Volumina von Maus 1 (Abb. 2.14 a) stagnierte bereits vor einem Alter von 18 Monaten, während sich das Wachstum von Maus 2 (Abb. 2.14 b) immer noch in der exponentiellen Phase befand. Die mittlere Plaquewachstumsrate von Maus 1 war mit $0,21 \mu\text{m Woche}^{-1}$ etwas langsamer als die von Maus 2 ($0,27 \mu\text{m Woche}^{-1}$), aber nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 2.14 c auf der vorherigen Seite).

Für eine genaue Einordnung der Langzeitdaten der verschiedenen Mäuse wurden die Kinetiken von Plaquedichte und mittlerem Plaquevolumen verglichen. Dabei wurde der bestehende Zusammenhang zwischen der Plaquebeladung und der A β -Konzentration im Gehirn genutzt (Cirrito u. a., 2003; DeMattos u. a., 2002a). Aufgrund einer positiven Korrelation zwischen Plaquebeladung und Plaquedichte (Abb. 2.14 d), konnte die Plaquedichte als indirekter Prädiktor der A β -Konzentration bzw. A β -Produktion verwendet werden. Interessanterweise waren die Ausgangsbedingungen beider Mäuse sehr unterschiedlich. Maus 1 hatte eine initiale Plaquedichte von nur 9 mm^{-3} mit zwölf Monaten, die auf 22 mm^{-3} nach sechs Monaten anstieg (Abb. 2.14 e). Im Gegensatz dazu hatte Maus 2 bereits im Alter von zwölf Monaten eine Plaquedichte von 111 mm^{-3} , die sich innerhalb der sechs Monate Beobachtung auf 200 mm^{-3} fast verdoppelte. Ein Vergleich der Kinetik von der Maus aus dem Langzeitversuch über 15,5 Monate zeigte, dass die Plaquedichte mit zwölf Monaten ebenfalls sehr niedrig war, aber bis zu einem Alter von fast 24 Monaten stark anstieg, jedoch nicht das Niveau von Maus 2 erreichte (Abb. 2.14 e). Bis zu diesem Alter hielt auch die exponentielle Phase des Plaquewachstums an. Ein Vergleich der mittleren Plaquewachstumsraten von neu entstandenen und präexistenten Plaques aller drei Mäuse über einen Beobachtungszeitraum von mindestens sechs Monaten zeigte keinen signifikanten Unterschied ($0,30$ und $0,28 \mu\text{m Woche}^{-1}$, Abb. 2.14 f).

2.2.5 Zusammenhänge zwischen den kinetischen Parametern des Plaquewachstums

Für eine weitere Charakterisierung der Plaquentstehung und des Plaquewachstums werden im folgenden Abschnitt die Zusammenhänge zwischen den gemessenen Parametern Plaquedichte, Plaquewachstumsrate, Plauegröße und Zeitpunkt der Plaquentstehung dargelegt. Im frühen Stadium der Entwicklung amyloider Plaques (zwölf bis 14 Monate) war eine signifikante positive Korrelation von Plaquedichte und Plaquentstehungsrate, einem Maß wieviele Plaques pro Volumen- und Zeiteinheit entstehen, zu detektieren (Abb. 2.15 a auf dieser Seite). Ein globaler Vergleich

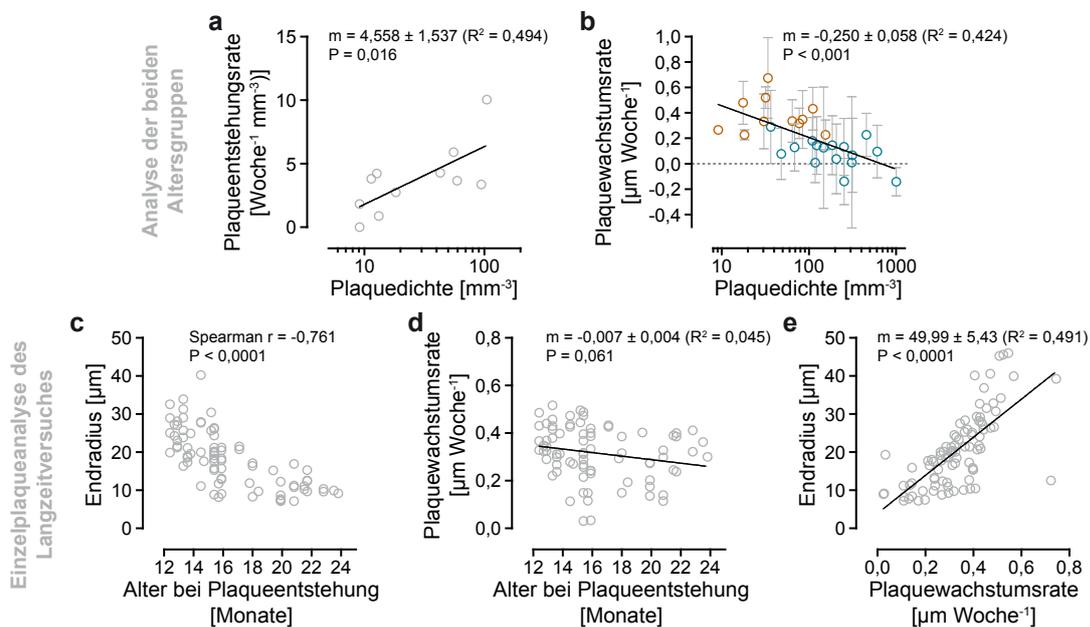


Abb. 2.15: Korrelationen verschiedener Parameter der Entstehungs- und Wachstumskinetik amyloider Plaques. In der jungen Altersgruppe gab es eine positive Korrelation zwischen der Plaquentstehungsrate (Anzahl der entstandenen Plaques pro Woche und pro Kubikmillimeter) und der Plaquedichte zu Beginn der Untersuchung (a, 12 Monate). Die Datenpunkte repräsentieren die Werte für jede mikroskopierte Position (zwölf Positionen in vier Mäusen). Ein Vergleich der Plaquewachstumsraten mit den Plaquedichten am Ende des Experimentes zeigte eine signifikante negative Korrelation (b). Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte der Plaquewachstumsraten mit den 95%-Konfidenzintervallen für jede mikroskopierte Position dar (27 Positionen). Orangefarbene und blaue Kreise repräsentieren jeweils die Daten der jungen und alten Gruppe (zwölf bis 14 und 18 bis 21 Monate). Der Radius der neu entstandenen Plaques am Ende des Langzeitversuches über 15,5 Monate korrelierte stark invers mit dem Alter der Maus bei Plaquentstehung (c), während parallel zur Plaquewachstumsrate kein statistischer Zusammenhang feststellbar war (d, 81 neuentstandene Plaques aus zwei Positionen). Eine starke positive Korrelation ergab sich aus dem Vergleich von Endradius und Plaquewachstumsrate von neu entstandenen und präexistente Plaques (e, 90 Plaques). Statistische Tests: lineare Regression mit anschließender Testung auf Ungleichheit des Anstieges von Null mittels F-Test, nicht-parametrische Korrelation nach Spearman.

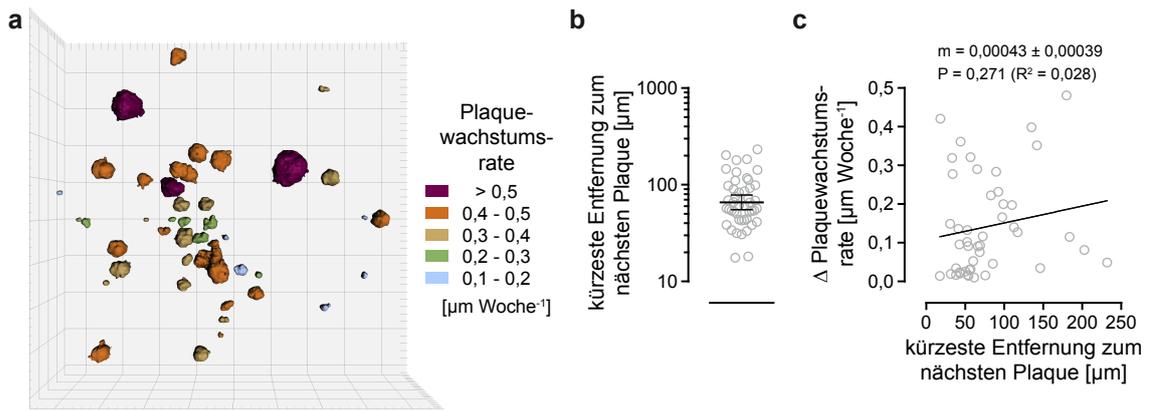


Abb. 2.16: Ortsaufgelöste Darstellung der Plaquetwachstumsgeschwindigkeit. In a ist ein dreidimensionales Bild mit Oberflächen-gerenderten Plaques der bereits gezeigten Position aus dem Langzeitversuch zu sehen. Die Wachstumsraten der einzelnen Plaques wurden in Klassen eingeteilt, welche farblich codiert im Bild dargestellt wurden. Für jeden Plaque wurde die kürzeste Distanz zum nächstgelegenen Plaque berechnet. Die Daten beider analysierter Positionen (90 Plaques) wurden im Diagramm unter b als Kreise dargestellt, während die Linie den Mittelwert mit dem 95%-Konfidenzintervall zeigt. Ein Vergleich der kürzesten Distanz mit der Differenz der Wachstumsraten zweier Plaques ergab keine signifikante Korrelation (c, lineare Regression mit anschließender Testung auf Ungleichheit des Anstieges von Null mittels F-Test). Der Maßstab repräsentiert 100 μm .

aller Daten der jungen und alten Gruppe zeigte, dass die Plaquetwachstumsrate invers mit der Plaquedichte korrelierte (Abb. 2.15 b auf der vorherigen Seite).

Eine Einzelplaqueanalyse ließ aufgrund des langen Beobachtungszeitraumes der einen Maus von der sehr frühen, exponentiellen Plaquetentstehungsphase bis zur asymptotischen Wachstumsphase nach über einem Jahr weitere Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten amyloider Plaques zu. Eine starke negative Korrelation von der Plaquetgröße am Ende der Untersuchung und dem Alter der Maus bei Plaquetentstehung zeigte, dass die am Ende größten Plaques zeitig während der Plaquetentwicklungsphase entstanden (Abb. 2.15 c). Im Gegensatz dazu gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Plaquetwachstumsraten der einzelnen Plaques und dem Alter der Maus bei Entstehung der Plaques (Abb. 2.15). Die Plaquetgröße am Ende der Untersuchung korrelierte sehr stark mit der Plaquetwachstumsrate (Abb. 2.15 e).

Eine weitere interessante Frage war, ob benachbarte Plaques mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wuchsen, da das Spektrum der Wachstumsraten sehr breit war (0 bis $0,8 \mu\text{m Woche}^{-1}$ in jungen Tieren, Abb. 2.10 f auf Seite 42). Diese Auswertung wurde mit den Daten aus dem Langzeitversuch durchgeführt, da hier die Wachstumsraten aufgrund der zeitlichen Länge der Beobachtung relativ genau bestimmt werden konnten. Für einen visuellen Eindruck wurden in Abbildung 2.16 a auf der

vorherigen Seite die Plaques als dreidimensionale Oberflächen-gerenderte Objekte dargestellt, deren Farbe die Wachstumsraten in fünf Kategorien codierte. Von jedem Plaque wurde die kürzeste Entfernung zum nächstgelegenen Plaque berechnet. Die mittlere kürzeste Entfernung zum nächsten Plaque betrug in diesem Beispiel 66 μm (Abb. 2.16 b auf der vorherigen Seite). Im Falle einer räumlichen Beziehung wären die Wachstumsraten benachbarter Plaques sehr ähnlich und die Differenz ihrer Plaquewachstumsraten müsste mit der kürzesten Entfernung zum nächsten Plaque korrelieren. Für die 90 Plaques aus dem Langzeitversuch konnte keine Korrelation detektiert werden, was sich in dem Beispielbild widerspiegelte (Abb. 2.16 a, c).

2.3 Der Einfluss einer passiven Immunisierung gegen A β -Oligomere auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques und die Synapsendichte

In diesem Abschnitt werden die Wirkungen einer passiven Immuntherapie gegen verschiedenen A β -Aggregate auf die Wachstumsgeschwindigkeit amyloider Plaques und die Synapsendichte in verschiedenen Gehirnregionen in dem Tg2576 Alzheimer-Mausmodell beschrieben. Seit der ersten Publikation einer passiven Immuntherapie von Bard u. a. (2000) gegen das A β_{1-42} -Peptid wurden zahlreiche weitere Studien veröffentlicht, die die positiven Effekte bestätigten (siehe Abschnitt 1.4 auf Seite 16). Während des Aggregationsprozesses von A β -Peptiden entstehen zahlreiche Zwischenstufen von Oligomeren, über Protofibrillen bis hin zu vollentwickelten Fibrillen, die wiederum zu amyloiden Plaques aggregieren (Abb. 2.17 auf der nächsten Seite). Von all diesen Molekülspezies wurde A β -Oligomeren eine besonders toxische Wirkung auf synaptische Mechanismen zugeschrieben, die für das Lernen und Gedächtnis wichtig sind (Walsh u. a., 2002, 2004). Hillen u. a. (2010) entwickelten einen Antikörper, der sehr spezifisch an A β -Oligomeren bindet und deren toxische Wirkung neutralisiert. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss dieses für A β -Oligomere spezifischen monoklonalen Antikörpers (Klon A-887755) auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques *in vivo* untersucht und mit einem Antikörper verglichen, der von monomeren A β bis zu hochmolekularen Aggregaten alles erkennt (Klon 6G1, Abb. 2.17). Zusätzlich wurden die Synapsendichten in verschiedenen Gehirnregionen post mortem in der Nähe und abseits von amyloiden Plaques gemessen, um auf mögliche therapeutische Effekte hinsichtlich der strukturellen Korrelate von

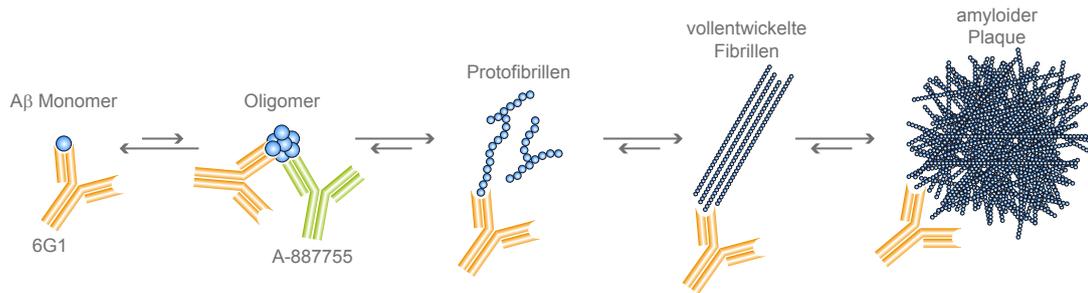


Abb. 2.17: Darstellung der verschiedenen A β -Aggregate bei der Plaquentstehung mit dem Wirkprinzip der im Therapieversuch getesteten Antikörper. Im Aggregationsprozess von A β -Monomeren (blaue Kreise) entstehen zunächst Oligomere, wobei die bevorzugte Konformation monomeres A β ist (dargestellt durch unterschiedlich große Pfeile). Aus den Oligomeren bilden sich durch weitere Zusammenlagerung Protofibrillen und Fibrillen, die eine β -Faltblattstruktur aufweisen. Ein amyloider Plaque besteht wiederum aus sehr vielen Fibrillen. Für die passive Immunisierung wurden zwei verschiedene monoklonale Mausantikörper verwendet. Der 6G1 Antikörper (orange) erkennt jede Art des A β -Peptids von Monomeren bis hin zu Fibrillen. Die Bindungseigenschaften sind ähnlich dem in der Routinediagnostik verwendeten 6E10 Antikörper. Der A-887755 Antikörper (grün) bindet hochspezifisch A β -Oligomere, aber keine Monomere und auch keine fibrillären Aggregate.

Lernen und Gedächtnis zu testen. Für diese Versuche wurden auch Wildtyptiere untersucht, um Unterschiede zu den AD-transgenen Tieren feststellen zu können.

2.3.1 Einfluss einer passiven Immuntherapie auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques in vivo

Aufgrund der hohen Variabilität der Plaquedichte zwischen einzelnen Tieren (siehe Abb. 2.10 a, d auf Seite 42) und der damit verbundenen geringen Sensitivität der post mortem Messung von Therapieeffekten bezüglich des Plaquewachstums wurde die Intravitalmikroskopie genutzt, um das individuelle Plaquewachstum über die Zeit zu messen. Für die Therapiestudie wurden ausschließlich weibliche Tg2576 Mäuse verwendet, deren Alter zu Beginn des Experimentes zwölf Monate betrug. In diesem Alter war die amyloide Pathologie in einer dynamischen Phase, in der die Plaques kontinuierlich wuchsen und neue Plaques entstanden (2.10 auf Seite 42). Es wurden drei verschiedene Gruppen behandelt, eine mit dem A β -Oligomer Antikörper (A-887755), eine mit dem pan-A β erkennenden Antikörper (6G1) und eine mit einem unspezifischen Antikörper (IgG2a Isotypkontrolle) als Kontrolle, der kein A β erkannte. Zusätzlich wurde eine vierte Gruppe untersucht, die keiner therapeutischen Behandlung unterzogen wurde. Diese Gruppe entsprach der jungen Altersgruppe aus der detaillierten Charakterisierung des Plaquewachstums (Abb. 2.9 auf Seite 40). Das kraniale Fenster wurde mindestens drei Wochen vor dem Start des

Mikroskopierens implantiert, um eine ausreichende Regeneration nach der Operation zu gewährleisten (siehe Abschnitt 4.2.1 auf Seite 111). Die Mäuse wurden einmal pro Woche über einen Zeitraum von acht Wochen mikroskopiert. Zur Messung des Plaquewachstums wurde einen Tag vor jeder Mikroskopiesitzung der Amyloid-bindende Fluoreszenzfarbstoff Methoxy-X04 intraperitoneal injiziert, wie bereits in den vorangegangenen Experimenten beschrieben (siehe Abschnitt 2.2 auf Seite 34). Die wöchentliche Dosis der Antikörper betrug 500 μg (Hillen u. a., 2010) und wurde direkt nach der Mikroskopiesitzung intraperitoneal injiziert. Während der Injektion waren die Tiere noch unter Narkose, sodass die Tiere keinem unnötigen Stress ausgesetzt waren. Die Behandlung wurde über den Beobachtungszeitraum von acht Wochen fortgesetzt (entsprach acht Dosen). Um einen Einfluss des Experimentators auszuschließen, wurde der Versuch verblindet durchgeführt. Aus logistischen Gründen waren die Tiere bekannt, die zu einer Behandlungsgruppe gehörten, aber nicht welcher Antikörper ihnen appliziert wurde. Die Bildserien wurden ebenfalls verblindet ausgewertet. Die Bestimmung der Plaquegröße über die Zeit wurde durch Messung des Plaquevolumens mittels dreidimensionalem Oberflächen-Rendering durchgeführt (siehe Abschnitt 4.4.3 auf Seite 123). Zur Linearisierung des Plaquewachstums wurde der Radius der Plaques unter der Annahme berechnet, dass Plaques annähernd die Form einer Kugel besaßen (siehe Abbildung 4.4 auf Seite 124).

Die amyloide Pathologie der Gruppen zu Beginn des Versuches war nicht signifikant unterschiedlich, sodass von gleichen Ausgangsbedingungen für die Therapie ausgegangen werden konnte. Als Parameter zur Quantifizierung der Ausgangsbedingungen wurden der mittlere Plaqueradius, der im Bereich von 7,3 bis 8,3 μm lag und die mittlere Plaquedichte, welche zwischen 24 und 34 mm^{-3} schwankte, für jede Gruppe bestimmt (Abb. 2.18 auf der nächsten Seite). Ein Vergleich der Plaquedichten zu Beginn des Versuches mit den Werten am Ende zeigte für jede Gruppe einen signifikanten Anstieg der Plaquedichte (Abb. 2.18). Als Maß wie viele neue Plaques pro Woche und Volumen entstanden, wurde für jede Maus eine Plaqueentstehungsrate berechnet. Die mittleren Plaqueentstehungsraten waren nicht unterschiedlich zwischen den Therapiegruppen und lagen zwischen 2,9 und 5,6 $\text{Woche}^{-1} \text{mm}^{-3}$ (Abb. 2.18 d auf der nächsten Seite). Auffällig war die sehr große Variabilität der Plaqueentstehungsraten zwischen einzelnen Mäusen, die ebenfalls für die Plaquedichten zu verzeichnen war. Die mittleren Plaquewachstumsraten waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Therapiegruppen – für

2. Ergebnisse

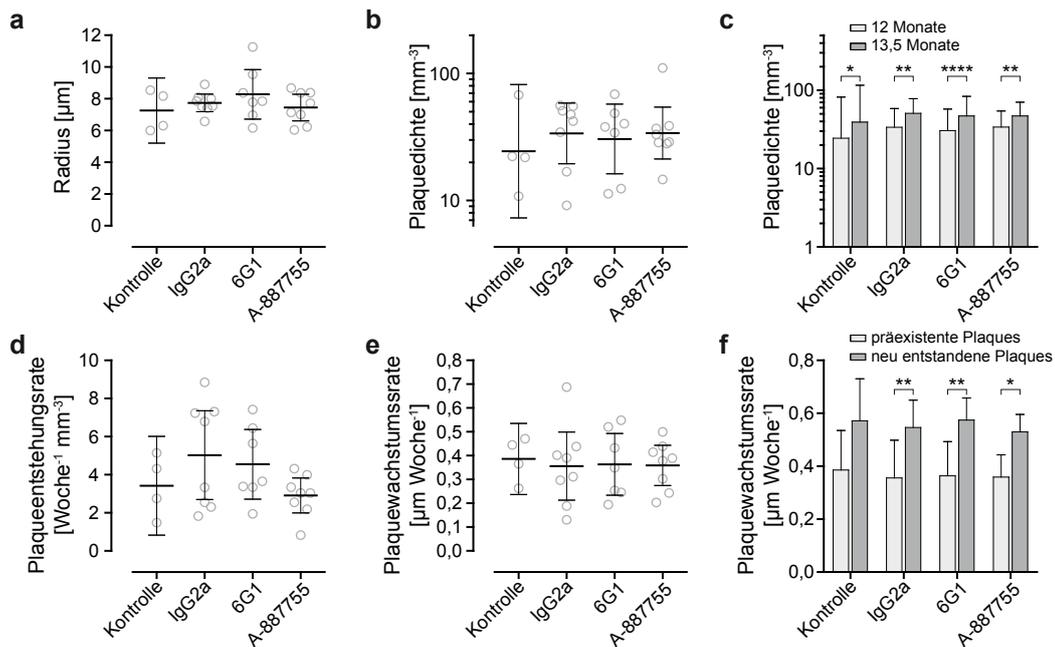


Abb. 2.18: Einfluss der passiven Immunisierung auf das Wachstum fibrillärer Plaques. Die initialen Konditionen, gemessen als mittleren Plaqueradius (**a**) und Plaquedichte (**b**) waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Therapiegruppen. Die grauen Kreise stellen die Mittelwerte aller Daten einzelner Mäuse dar und die schwarzen Linien mit den Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert der Gruppen mit den 95 %-Konfidenzintervallen (gilt für jedes Diagramm in der Abbildung). Die Versuchsgruppen bestanden aus einer Kontrollgruppe ohne jegliche Behandlung (50 neu entstandene/101 präexistente Plaques), einer zweiten Kontrollgruppe, die mit einem unspezifischen IgG2a Antikörper behandelt wurde (140/267) und einer mit pan-A β (6G1, 113/232) sowie A β -Oligomer (A-887755, 83/278) Antikörper behandelten Gruppe. Die Mäuse wurden einmal pro Woche über einen Zeitraum von acht Wochen immunisiert und im gleichen Zeitschema mikroskopiert. Das beobachtete Volumen betrug insgesamt 19,2 mm^3 . Ein Vergleich der Plaquedichten zu Beginn des Versuches (Mäuse im Alter von zwölf Monaten) und sechs Wochen danach zeigte einen signifikanten Unterschied für alle Gruppen (**c**). Die Plaquedichten am Ende unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Ein Einfluss durch die Immunisierung auf die kinetischen Parameter Plaqueentstehungsrate und Plaquewachstumsrate konnte nicht festgestellt werden (**d**, **e**). Die neu entstandenen Plaques wuchsen schneller über einen Zeitraum von acht Wochen (**f**, außer Kontrollgruppe). Alle Balken stellen den arithmetischen Mittelwert dar, gebildet aus den Mittelwerten aller Daten generiert aus einer Maus. Es wurden folgende statistische Tests verwendet: einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test (**a**, **b**, **d**, **e**), einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's Post-hoc-Test für ausgewählte Vergleiche (**f**), t-Test für gepaarte Proben (**c**). * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$

neu entstandene und präexistente Plaques (Abb. 2.18 e, f auf dieser Seite). Ein Vergleich innerhalb der Therapiegruppen zeigte, dass die neu entstandenen Plaques signifikant schneller wuchsen als die präexistenten Plaques außer für die Kontrollgruppe ohne Behandlung (Abb. 2.18f). Der Grund hierfür lag in der geringeren Anzahl an untersuchten Mäusen bei gleichzeitiger Korrektur für Mehrfachvergleiche. Aufgrund mehrfacher Mittelwertbildung (aus allen einzelnen Plaques für jede

Position, anschließend für jede aus den Mittelwert der einzelnen Positionen) waren die Wachstumsraten normal-verteilt und parametrische statistische Tests konnten angewandt werden (zentrales Grenzwerttheorem).

2.3.2 Etablierung der Synapsenfärbung und -auswertung

Für eine differenzierte Analyse der Immuntherapie auf die Synapsen wurde eine Doppelfärbung eines präsynaptischen und eines postsynaptischen Markerproteins etabliert. Als präsynaptischer Marker wurde Synapsin ausgewählt, das als Adapterprotein fungiert und synaptische Vesikel an das Zytoskelett bindet (Abb. 2.19 a auf der nächsten Seite, Südhof (1995)). Es ist ein ubiquitärer Marker für Präsynapsen, der nahezu in jeder Präsynapse vorkommt, die mit einem dendritischen Spine assoziiert ist (Micheva u. a., 2010; Thiel, 1993). Um die postsynaptische Seite exzitatorischer Synapsen zu färben, wurde PSD-95 ausgewählt, das in der postsynaptischen Dichte (PSD) lokalisiert ist und sehr häufig als postsynaptischer Marker verwendet wird (Abb. 2.19 a, Micheva u. a. (2010); Ziff (1997)). Es gehört zur SAP Proteinfamilie (synapse-associated proteins, auch SAP90 genannt) und interagiert direkt mit NMDA-Rezeptoren (Fujita u. a., 2000; Gundelfinger u. a., 2000)). Für die Unterscheidung beider synaptischer Marker wurden primäre Antikörper aus zwei unterschiedlichen Wirtstieren ausgewählt (PSD-95 aus Maus, Synapsin aus Kaninchen, siehe Abschnitt 4.3.2 auf Seite 118). Zur Detektion wurden zwei hochspezifische Sekundärantikörper aus der Ziege verwendet, die entweder an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa647 (PSD-95) oder Alexa488 (Synapsin) gekoppelt waren. In einer Kontrolle konnte keine Kreuzreaktivität der Sekundärantikörper festgestellt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe konnten auch bei gleichzeitiger Anregung im grünen (500-550 nm) und roten Kanal (Langpass 650 nm) sehr gut voneinander getrennt werden. Zudem konnte als zusätzlicher Kanal die Fluoreszenzfärbung amyloider Plaques mittels Methoxy-X04 im blauen Kanal (435-485 nm) durch Zwei-Photonen-Anregung mit 750 nm detektiert werden (siehe Abschnitt 4.3.3 auf Seite 120). Die Immunfärbungen wurden mit 50 μ m dicken koronalen Gehirnschnitten durchgeführt, die mit einem Vibratom geschnitten wurden. Zuvor wurden die Mäuse am Ende des Therapieversuches im Alter von 14 Monaten transkardial perfundiert und die Gehirne mit Paraformaldehyd fixiert. In Abbildung 2.19 b und c sind Übersichtsaufnahmen eines koronalen Gehirnschnittes zu sehen, der für beide synaptischen Marker gefärbt wurde. Beide Färbungen zeigten in den dreidimensionalen Bildern ein punktförmiges Muster bei entsprechender Vergrößerung (hier CA1 Region im Hippocampus), de-

2. Ergebnisse

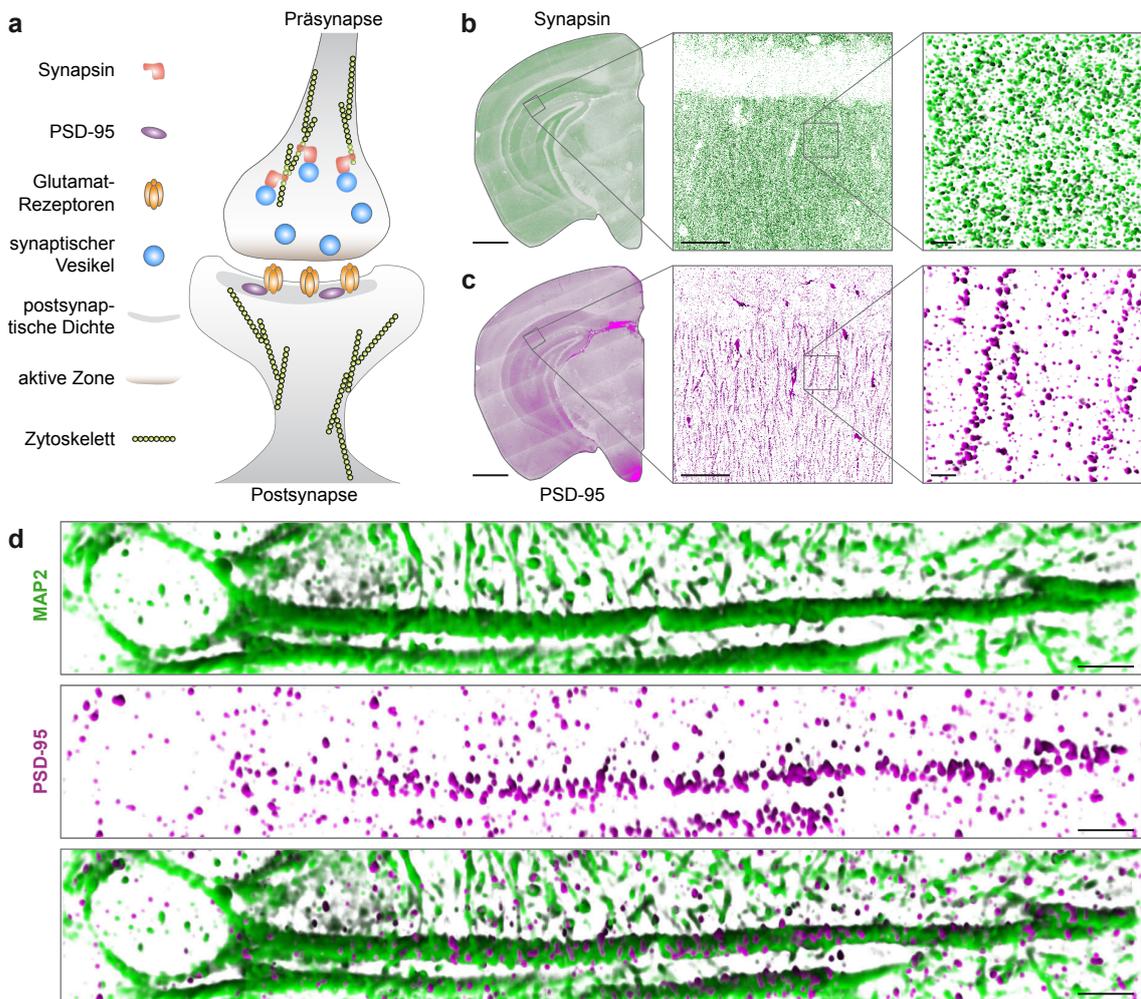


Abb. 2.19: Einführung in die Immunfärbung von Prä- und Postsynapsen. Für die Untersuchung von Prä- und Postsynapsen wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung etabliert. Als ubiquitärer Marker für Präsynapsen wurde das Adapterprotein Synapsin ausgewählt, das synaptische Vesikel an das Zytoskelett des synaptischen Boutons bindet (a). Um glutamaterge Postsynapsen zu detektieren, wurde PSD-95 als Markerprotein ausgewählt (a). Es ist ausschließlich in dem Proteinkomplex der postsynaptischen Dichte lokalisiert. Ein Übersichtsbild des selben koronalen Gehirnschnittes sind für Synapsin (b, Alexa488, grün) und PSD-95 (c, Alexa647, magenta) zu sehen. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen hoch aufgelöste konfokale Bilder aus der CA1 Region des Hippocampus. Es war deutlich eine punktförmige Färbung für beide Synapsenmarker zu erkennen. Zur Verifizierung der postsynaptischen Färbung wurde eine Doppelimmunfärbung des PSD-95 mit dem dendritischen Marker MAP-2 durchgeführt. Die punktförmigen Postsynapsen (PSD-95, magenta) assoziieren klar ersichtlich mit dem dendritischen Kompartiment (MAP-2, grün) in den hoch aufgelösten dreidimensionalen Volumengerenderten Bildern (d). Die Maßstäbe repräsentieren 1 mm (Übersichten, b, c), 50 μm (vergrößerte Ansichten, b, c) und 5 μm (vergrößerte Ansichten, b, c, d).

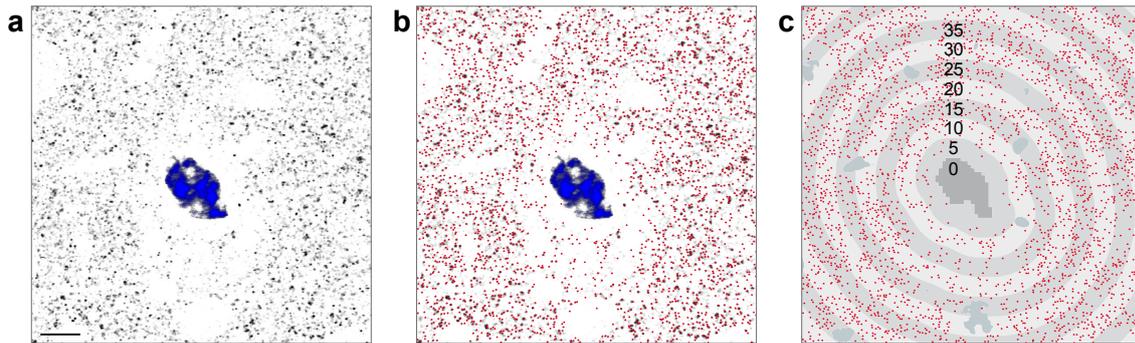


Abb. 2.20: Methode zur Auswertung der Synapsendaten. In **a** wurde ein konfokales Fluoreszenzbild der Synapsinfärbung (schwarz) mit einem Methoxy-X04 gefärbten, amyloiden Plaque (blau) dargestellt. Die Detektion der Synapsen erfolgte nach Anwendung des zweidimensionalen Laplace-Operators mit anschließender Schwellenwertsegmentierung. Der Schwellenwert wurde als zweifaches der Standardabweichung festgelegt. Von den segmentierten Objekten wurden die Massenschwerpunkte berechnet und als rote Punkte in **b** dargestellt. Der amyloide Plaque wurde durch eine einfache Schwellenwertsegmentierung detektiert (**c**, dunkelgraue Fläche). Um die Synapsendichte in Abhängigkeit zur Entfernung des amyloiden Plaques zu bestimmen, wurde für jeden Punkt im Bild der kleinste euklidische Abstand zum Plaque berechnet. Mit Hilfe dieser Daten wurden 5 μm breite Klassen um den Plaque herum bis zum Rand des Bildes erstellt (**c**, alternierende graue und hellgraue Streifen, Abstand zum Plaque wird angezeigt durch schwarze Zahlen in Mikrometer). Die Synapsendichten in Abhängigkeit des Abstandes zum Plaque wurden aus der Fläche der Streifen und der Anzahl innerhalb der Fläche liegenden Synapsen (rote Punkte) berechnet. Regionen in denen keine Synapsen vorhanden waren, z.B. Neurone und Blutgefäße, wurden ebenfalls durch eine Schwellenwertsegmentierung detektiert (helle Regionen in der Synapsinfärbung **a**, blaugraue Flächen **c**). Diese Flächen wurden vor der Berechnung der Synapsendichte von den Flächen der Streifen abgezogen. Der Maßstab repräsentiert 10 μm .

ren einzelne Punkte kleiner als ein Mikrometer waren und somit einzelne Synapsen darstellten. Da beide Marker in zwei unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert waren, war die Überlappung beider Signale sehr niedrig. Eine weitere Verifizierung der Färbung des postsynaptischen Kompartiments wurde durch Kofärbung mit dem dendritischen Markerprotein des Zytoskeletts MAP-2 (Microtubule-associated protein 2, Dehmelt u. a. (2005)) ermöglicht. Die punktförmigen Strukturen der PSD-95 Färbung, aneinander gereiht wie an einer Perlenkette, zu sehen in den vergrößerten Bildern im Stratum radiatum der CA1-Region (Abb. 2.19 c und d auf der vorherigen Seite), waren erwartungsgemäß mit den apikalen Dendriten (MAP-2-Färbung) der pyramidalen CA1-Neurone assoziiert (Abb. 2.19 d).

Die Bestimmung der Synapsendichten wurde automatisch mit einem aus Dorostkar u. a. (2010) adaptierten Programm in der Datenanalysesoftware IGOR Pro durchgeführt, da sehr große Datenmengen zu analysieren waren. Ein Problem bei der Detektion der Synapsen in den konfokalen Schnittbildern stellte die große Variation der Intensität einzelner Synapsen dar (Abb. 2.20 a auf dieser Seite). Aus

diesem Grund wurde der Laplace-Operator auf die zweidimensionalen Bilder angewandt, wodurch ein kanten-schärfender Effekt eintrat (Dorostkar u. a., 2010). Als zweite Ableitung der Intensität in den beiden Raumkoordinaten führte der Laplace-Operator zur Detektion von Strukturen, die sich in einem relativen Maß vom lokalen Hintergrund abgrenzten (siehe Abschnitt 4.4.4 auf Seite 124). Zur Detektion der Synapsen in dem Laplace-Operator-transformierten Bild wurde eine Schwellenwertsegmentierung durchgeführt, bei der der Schwellenwert auf das zweifache der Standardabweichung aller Werte aus diesem Bild festgelegt wurde. Für jede segmentierte Fläche einer Synapse wurde der Schwerpunkt zur Definierung des Ortes bestimmt (Abb. 2.20 b). Aus der Anzahl der detektierten Synapsen und der Gesamtfläche des Bildes konnte anschließend die Synapsendichte berechnet werden. Dabei wurden die Flächen von Neuronen und Blutgefäßen von der Gesamtfläche abgezogen. Diese stellten die freien Flächen in der Synapsinfärbung ohne Signal dar und konnten mittels einfacher Schwellenwertsegmentierung bestimmt werden (Abb. 2.20 c). Zur Untersuchung der Synapsendichten in Relation zum Abstand zu einem amyloiden Plaque wurde dieser zunächst mittels einfacher Schwellenwertsegmentierung detektiert und für jeden Pixel des Bildes der euklidische Abstand zum Plaque bestimmt. Aus diesen Daten wurden 5 μm breite Klassen um den Plaque herum bis zum Rand des Bildes eingeteilt (Abb. 2.20 c). Für jede Abstandsklasse wurde die Anzahl der darin enthaltenen Synapsen und die Synapsendichte anhand der Klassenfläche berechnet.

2.3.3 Ergebnisse zur Messung der Synapsendichten

Die Synapsendichten wurden abseits und in Relation zum Abstand von amyloiden Plaques untersucht. In Abbildung 2.21 auf der nächsten Seite wurden die Synapsendichten abseits vom Plaque dargestellt. Aufgrund der relativ geringen Plaquedichte im Alter von 14 Monaten war es sehr einfach Regionen ohne Plaques zu finden. Diese Messungen wurden in vier Gehirnregionen durchgeführt – Schicht I bis obere Schicht II im visuellen Cortex, dem Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus Dentatus, dem Stratum oriens und radiatum der CA1-Region des Hippocampus. Für die Färbungen wurden koronale Gehirnschnitte mit einer Dicke von 50 μm im Bereich von -3,3 bis -2,8 mm vom Bregma angefertigt (Paxinos u. a., 2001). Es wurden fünf von diesen zehn Gehirnschnitten angefärbt und pro Gehirnschnitt und Region wurden drei konfokale Fluoreszenzbilder aufgenommen. Die Einstellungen des Mikroskops wurden für jedes Bild in einer Weise vorgenommen, dass in jedem Kanal

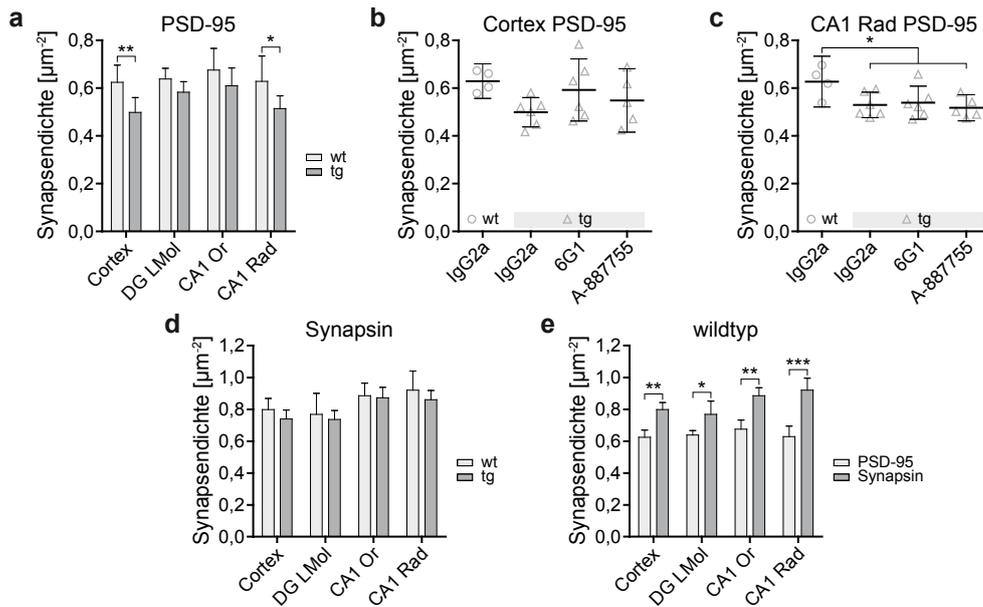


Abb. 2.21: Analyse der Synapsendichten abseits von amyloiden Plaques in verschiedenen Gehirnregionen. Die Ergebnisse für die Behandlung mit dem unspezifischen Kontrollantikörper für den postsynaptischen Marker PSD-95 wurden im Balkendiagramm dargestellt (a). Es wurden jeweils Wildtyptiere (wt, vier Mäuse) mit AD-transgenen Tieren (tg, sechs Mäuse) verglichen. Die Untersuchungen wurden in Schicht I/II des visuellen Cortex (Cortex) und den Subregionen des Hippocampus: Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus dentatus (DG LMol), Stratum oriens (Or) und Stratum radiatum (Rad) der CA1-Region durchgeführt. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyptieren und den AD-transgenen Tieren im visuellen Cortex und der CA1-Region des Stratum radiatum gefunden (a). Für beide Regionen wurden alle Ergebnisse der Behandlungsgruppen in b und c dargestellt. Die einzelnen Symbole stellen die Mittelwerte aller Daten einer Maus dar und die schwarzen Linien zeigen die Mittelwerte aller Gruppen. Im visuellen Cortex konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Dagegen war im Stratum radiatum ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyptieren (IgG2a) und AD-transgenen Tieren (IgG2a, A-887755) zu detektieren. Das Diagramm unter d zeigt die korrespondierenden Daten von a für die Präsynapsen (Synapsin als Marker). Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyptieren und AD-transgenen Tieren in den unterschiedlichen Regionen gefunden werden. Für die Wildtyptiere (IgG2a) gab es signifikante Unterschiede zwischen der Synapsendichte von Prä- und Postsynapsen (Synapsin, PSD-95) in allen untersuchten Gehirnregionen (e). Im Gegensatz dazu waren die Synapsendichten von Prä- und Postsynapsen zwischen den vier Gehirnregionen nicht unterschiedlich. Alle Fehlerbalken repräsentieren das 95 %-Konfidenzintervall. Es wurden folgende statistische Tests durchgeführt: einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni's Post-hoc-Test für ausgewählte mehrfache Vergleiche (a–d), einfaktorische Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test (e). * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

die hellsten Synapsen ein paar Pixel enthielten, bei denen das Signal gesättigt war. Dadurch wurde zum Einem der komplette Dynamikbereich des Detektors ausgenutzt und zum Anderen ließen sich die Bilder auf diese Weise sehr reproduzierbar einstellen, was sehr wichtig für eine quantitative Auswertung war. Insgesamt wurden 1260 Bilder aufgenommen, was bei einer Kantenlänge von $75 \mu\text{m}$ eines einzelnen Bil-

des einer Gesamtfläche von über 7 mm² entsprach. Die Bilder wurden automatisch mit der im vorherigen Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Bildanalyseroutine ausgewertet (siehe auch Abschnitt 4.4.4 auf Seite 124).

Abseits von amyloiden Plaques wurden in der mit dem unspezifischen Kontrollantikörper behandelten Gruppe (IgG2a) für den postsynaptischen Marker PSD-95 signifikant niedrigere Synapsendichten in den AD-transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren im visuellen Cortex und dem Stratum radiatum der CA1-Region detektiert (Abb. 2.21 a auf der vorherigen Seite). Der gleiche Trend war in den beiden anderen Regionen vorhanden (Stratum lacunosum-moleculare und Stratum oriens), zeigte aber keine statistische Signifikanz. Die Behandlung mit den beiden therapeutischen Antikörpern, die entweder jede Form des A β -Peptids (6G1) oder selektiv A β -Oligomere (A-887755) binden, führte zu einer Erhöhung der Synapsendichte im Vergleich zu den mit dem Kontrollantikörper behandelten Tieren im visuellen Cortex (Abb. 2.21 b). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Ein Grund dafür war die deutlich erhöhte Varianz der Daten in beiden Gruppen. Zudem war der Unterschied in der Kontrollgruppe zwischen den Wildtyptieren und den AD-transgenen Tieren aufgrund der Mehrfachvergleiche nicht mehr signifikant, was eine Interpretation der Daten umso schwieriger machte. Im Stratum radiatum der CA1-Region waren die Synapsendichten der behandelten Tiere nicht unterschiedlich zu den Synapsendichten der AD-transgenen Kontrollgruppe (Abb. 2.21 c). Es wurden signifikant niedrigere Synapsendichten für die AD-transgenen Tieren, die mit dem Kontrollantikörper oder dem A β -Oligomer-spezifischen Antikörper behandelt wurden, im Vergleich zu den Wildtyptieren gemessen. Aufgrund der erhöhten Varianz in der 6G1 Antikörper behandelten Gruppe war der Unterschied zu den Wildtyptieren nicht signifikant, aber ungefähr genauso groß wie für die beiden anderen Gruppen.

Für den präsynaptischen Marker Synapsin wurden keine signifikanten Unterschiede der Synapsendichten zwischen den mit dem Kontrollantikörper (IgG2a) behandelten AD-transgenen Tieren und Wildtyptieren in den verschiedenen Gehirnregionen detektiert (Abb. 2.21 d). Es zeichnete sich der gleiche Trend zu niedrigeren Synapsendichten in den AD-transgenen Tieren ab, wie für den postsynaptischen Marker PSD-95. Ein Vergleich der Dichten beider synaptischer Marker zeigte signifikant niedrigere Werte für den postsynaptischen Marker in allen untersuchten Gehirnregionen (Abb. 2.21 e). Zwischen den verschiedenen Gehirnregionen wurden keine signifikanten Unterschiede der Synapsendichten von PSD-95 und Synapsin detektiert.

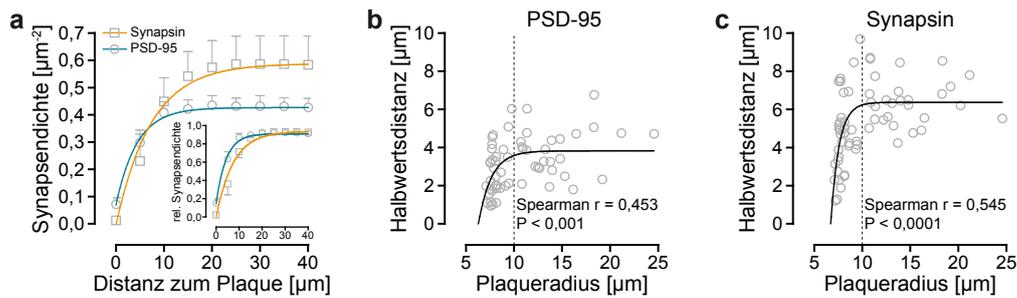


Abb. 2.22: Analyse der Synapsendichten in der Umgebung von amyloiden Plaques im zerebralen Cortex. In **a** wurden die Synapsendichten in Abhängigkeit vom Abstand zum amyloiden Plaque für die synaptischen Marker PSD-95 und Synapsin aus der Kontrollgruppe (IgG2a) dargestellt. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte von sechs Mäusen. Es wurde eine nichtlineare Regression mit einer einphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion durchgeführt ($R^2=0,901$ für PSD-95 und $0,798$ für Synapsin). Beide Kurven unterschieden sich signifikant in dem Plateau (PSD-95: $0,427 \mu\text{m}^{-2}$, Synapsin: $0,588 \mu\text{m}^{-2}$) und der Halbwertsdistanz, der Distanz bei der die Hälfte der Spanne der Kurve erreicht wurde (PSD-95: $3,02 \mu\text{m}$, Synapsin: $5,09 \mu\text{m}$, $P < 0,01$). Das eingebettete Diagramm zeigt die relative Synapsendichte, normiert zum Maximum des Plateaus. Es gab eine signifikante positive Korrelation zwischen der Halbwertsdistanz und dem Plaqueradius für PSD-95 und Synapsin (**b**, **c**). Die schwarzen Linien stellen die in einer Regressionsanalyse angepassten einphasigen exponentiellen Assoziationskurven dar. Es wurden folgende statistische Tests verwendet: F-Test (**a**), Spearman Korrelation (**b**, **c**).

Die Untersuchung der Synapsendichten in Relation zur Entfernung von amyloiden Plaques wurde in den gleichen Gehirnschnitten durchgeführt wie die Untersuchung der Synapsendichten abseits von Plaques. Für jede Maus wurden zehn Plaques im zerebralen Cortex analysiert. Zur Auswertung wurden nach der Segmentierung der amyloiden Plaques Entfernungsklassen mit einer Breite von $5 \mu\text{m}$ um den Plaque herum eingeteilt. Für jede Entfernungsklasse wurde separat die Synapsendichte bestimmt (Abb. 2.20 auf Seite 57). Der Zusammenhang von Synapsendichte und Entfernung zum amyloiden Plaque wurde in der Abbildung 2.22 a auf dieser Seite für den postsynaptischen Marker PSD-95 und den präsynaptischen Marker Synapsin für die mit dem Kontrollantikörper behandelten Tiere (IgG2a) dargestellt. Innerhalb der amyloiden Plaques waren die Synapsendichten beider Marker am geringsten mit Werten nahe Null. Die Synapsendichte stieg mit zunehmenden Abstand an bis ein einheitliches Niveau erreicht wurde. Der asymptotische Verlauf dieser Kurven ließ sich sehr gut durch eine einphasige exponentielle Assoziationskurve beschreiben (Abb. 2.22 a). Die Plateaus beider Regressionen unterschieden sich signifikant, was bereits bei der Synapsenuntersuchung abseits vom Plaque beobachtet wurde (siehe Abb. 2.21 e auf Seite 59). Ein weiterer charakteristischer Parameter aus der Regression war die Halbwertsdistanz, bei der die Hälfte der Synapsendichte zwischen Plateau

und Synapsendichte innerhalb des Plaques erreicht wurde. Ein Vergleich beider Marker zeigte signifikante Unterschiede der Halbwertsdistanzen. Diese betragen $3,02 \mu\text{m}$ für PSD-95 und $5,09 \mu\text{m}$ für Synapsin. Als anschaulicherer Parameter wurde mit Hilfe der Regressionsfunktion beider synaptischer Marker die Distanz berechnet, bei der 95 % der Plateaus erreicht wurde. Diese Entfernung vom amyloiden Plaque wurde als Einflussbereich definiert, innerhalb dessen sich die toxische Wirkung des amyloiden Plaques entfaltet. Für den postsynaptischen Marker PSD-95 war der Einflussbereich mit einem Abstand zum Plaque von $12,3 \mu\text{m}$ wesentlich kleiner als für den präsynaptischen Marker Synapsin mit $22,1 \mu\text{m}$. Der Unterschied zwischen den Halbwertsdistanzen und dem Einflussbereich war noch besser in den normierten Diagrammen zu erkennen, bei denen die Synapsendichten relativ zum Plateau abseits vom Plaque dargestellt wurden (Abb. 2.22 a, eingebettetes Diagramm). Eine Untersuchung einzelner Plaques zeigte eine signifikante positive Korrelation zwischen der Halbwertsdistanz und dem Plaqueradius für PSD-95 (Abb. 2.22 b) und Synapsin (Abb. 2.22 c). Mit zunehmendem Plaqueradius stiegen die Halbwertsdistanzen an, aber für größere Plaques ab einem Plaqueradius von ungefähr $10 \mu\text{m}$ schwankten die Werte um ein Plateau. Der Zusammenhang zwischen Plaqueradien und Halbwertsdistanzen konnte sehr gut mit einer einphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion beschrieben werden, deren Plateaus bei $3,8 \mu\text{m}$ (PSD-95) und $6,4 \mu\text{m}$ (Synapsin) lagen.

Die gleiche Auswertung wurde für die mit den therapeutischen Antikörpern behandelten Gruppen (6G1, A-887755) durchgeführt. Da ein Zusammenhang zwischen Plaquergröße und Synapsendichte existierte, wurden zunächst die mittleren Plaqueradien der Gruppen miteinander verglichen und keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abb. 2.23 a auf der nächsten Seite). Die Synapsendichten in Relation zur Entfernung von den Plaques wurden in den Diagrammen in Abbildung 2.23 für PSD-95 (b) und für Synapsin (c) dargestellt. Ein Vergleich der nichtlinearen Regressionen zeigte, dass das Plateau der mit den therapeutischen Antikörpern behandelten Gruppen (6G1, A-887755) signifikant höher war als in der Kontrollgruppe, während kein Effekt für die Halbwertsdistanzen gemessen wurde. Als weitere Kontrolle wurde der Zusammenhang zwischen Synapsendichten und der Entfernung von Pseudoplaques, einer Auswahl verschieden großen Plaques aus den AD-transgenen Tieren, in Wildtyptieren untersucht. Für beide synaptischen Marker waren die Verläufe der Synapsendichten linear ohne Abfall in der Nähe der Pseudoplaques. Die Plateaus der Synapsendichten der therapierten Tiere (6G1, A887755) waren höher als die Pla-

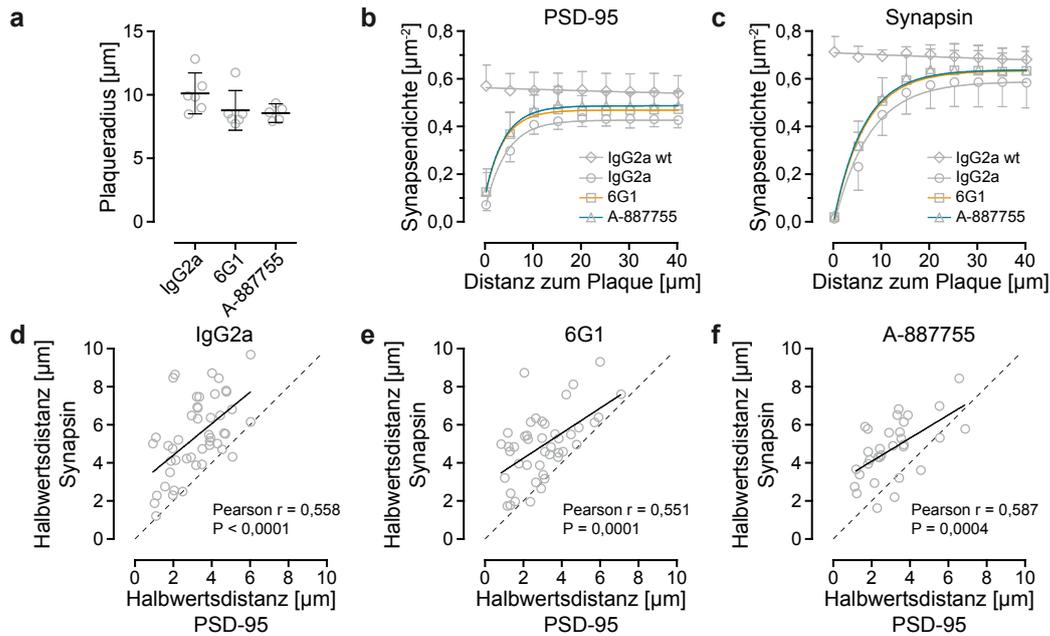


Abb. 2.23: Therapieeffekte auf die Synapsendichten in der Umgebung von amyloiden Plaques im zerebralen Cortex. Die mittleren Plaqueradien waren nicht unterschiedlich zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen (a). Jedes Symbol repräsentiert die mittlere Plaquergröße einer Maus und die schwarzen Linien zeigen die Mittelwerte der Gruppen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Die Synapsendichten in Abhängigkeit von der Entfernung zum Plaque wurden für die drei Behandlungsgruppen (IgG2a, 6G1, A-887755) und die beiden synaptischen Marker PSD-95 (b) und Synapsin (c) untersucht. Die Symbole zeigen die Mittelwerte der Gruppen mit den 95 %-Konfidenzintervallen. Für jede Gruppe wurde eine einphasige exponentielle Assoziationsfunktion angepasst und auf Unterschiedlichkeit der Plateaus statistisch getestet. Es wurde ein signifikanter Unterschied für die beiden Behandlungsantikörper (6G1, A-887755) im Vergleich zum Kontrollantikörper (IgG2a) festgestellt, sowohl für den synaptischen Marker PSD-95 ($P < 0,0001$) als auch Synapsin ($P < 0,01$). Zusätzlich wurde die Auswertung für Wildtyptiere zur Kontrolle durchgeführt, indem eine Auswahl verschieden großer Plaques aus den AD-transgenen Tieren mit den Synapsenbildern aus den Wildtyptieren analysiert wurden. Die Synapsendichte änderte sich erwartungsgemäß nicht mit dem Abstand zu den Pseudoplaques (b, c). Die Korrelationen der Halbwertsdistanzen von Synapsin und PSD-95 waren stark signifikant für alle drei Gruppen (d–e). Die Kreise stellen die Wertepaare für einzelne Plaques dar. Die gestrichelte Linie repräsentiert eine Gerade gleicher Wertepaare und die schwarzen Linien zeigen die lineare Regression zu den jeweiligen Daten. Ein signifikanter Unterschied wurde für die Achsenabschnitte der Regressionsgeraden aller Behandlungsgruppen im Vergleich zum Achsenabschnitt der Gerade gleicher Wertepaare gemessen ($P < 0,05$). Es wurden folgende statistische Tests verwendet: einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test (a), F-Test (b–f), Pearson Korrelation (d–e).

teaus der Regressionen in den Wildtyptieren für den jeweiligen synaptischen Marker (Abb. 2.23 b, c). In jeder Behandlungsgruppe gab es eine starke positive Korrelation zwischen den Halbwertsdistanzen von Synapsin und PSD-95 (Abb. 2.23 d–f). Eine lineare Regression der Daten zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Anstiegen im Vergleich zum Anstieg einer theoretischen Gerade gleicher Werte

(gestrichelte Linie in Abb. 2.23 d-f). Die Achsenabschnitte waren für jede Gruppe signifikant höher als zu der theoretischen Gerade, was dem visuellen Eindruck im Diagramm entsprach, dass nahezu jede Halbwertsdistanz eines Plaques für den präsynaptischen Marker Synapsin größer war als für den postsynaptischen Marker PSD-95.

2.3.4 Lokalisation verschiedener A β -Aggregate *in vivo*

Eine weitere Anwendung der A β -bindenden Antikörper, insbesondere des spezifisch an A β -Oligomere bindenden Antikörpers, war die Untersuchung der Lokalisation verschiedener A β -Aggregate im Gehirn lebender AD-transgener Mäuse. Diese Methode wurde erfolgreich eingeführt von Bacskai u. a. (2001), die erstmals A β -Plaques mit einem A β -bindenden Antikörper, an den ein Fluorophor gekoppelt war, *in vivo* gefärbt und mikroskopiert haben. Koffie u. a. (2009) benutzten die gleiche Technik, um eine Akkumulation von A β -Oligomeren in der Umgebung amyloider Plaques nachzuweisen. Der in dieser Studie verwendete Antikörper (NAB61) wies nicht die gleiche selektive Charakteristik wie der A-887755 Antikörper auf und bindete auch monomere A β -Moleküle und fibrilläre A β -Aggregate (E. B. Lee u. a., 2006). Aus diesem Grund sollte eine mögliche Akkumulation des A β -Oligomer-selektiven Antikörpers A-887755 in der Nähe amyloider Plaques *in vivo* untersucht werden, um das Ergebnis von Koffie u. a. (2009) zu überprüfen. Als Positivkontrolle wurde der pan-A β -bindende Antikörper 6G1 und als Negativkontrolle eine nicht an A β -Moleküle bindende IgG2a-Isotypkontrolle verwendet.

Die Untersuchungen wurden in 13,5 bis 16,3 Monate alten Tg2576 Mäusen (pro Antikörper zwei Mäuse) durchgeführt. In diesem Altersbereich war die Plaquentstehung immer noch dynamisch und die Plaquedichte war definitiv größer Null (siehe Abb. 2.10 auf Seite 42). Zur Visualisierung mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Antikörper mit dem synthetischen Fluorophor Alexa594 gekoppelt, das einen hohen Wirkungsquerschnitt für die Zwei-Photonen-Anregung besitzt und dadurch sehr gut für die *in vivo* Untersuchung geeignet war (C. Xu u. a., 2008). Zur Detektion amyloider Plaques wurde Methoxy-X04 verwendet, das ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 466 nm erreichte. Das Emissionsmaximum von Alexa594 lag mit 618 nm sehr weit entfernt, sodass die Fluoreszenzsignale beider Fluorophore relativ gut, aber nicht perfekt voneinander getrennt werden konnten (siehe Abschnitt 4.2.4 auf Seite 116). Da das Fluoreszenzsignal von Methoxy-X04 aufgrund der großen Mengen an fibrillären A β -Aggregaten innerhalb der Plaques

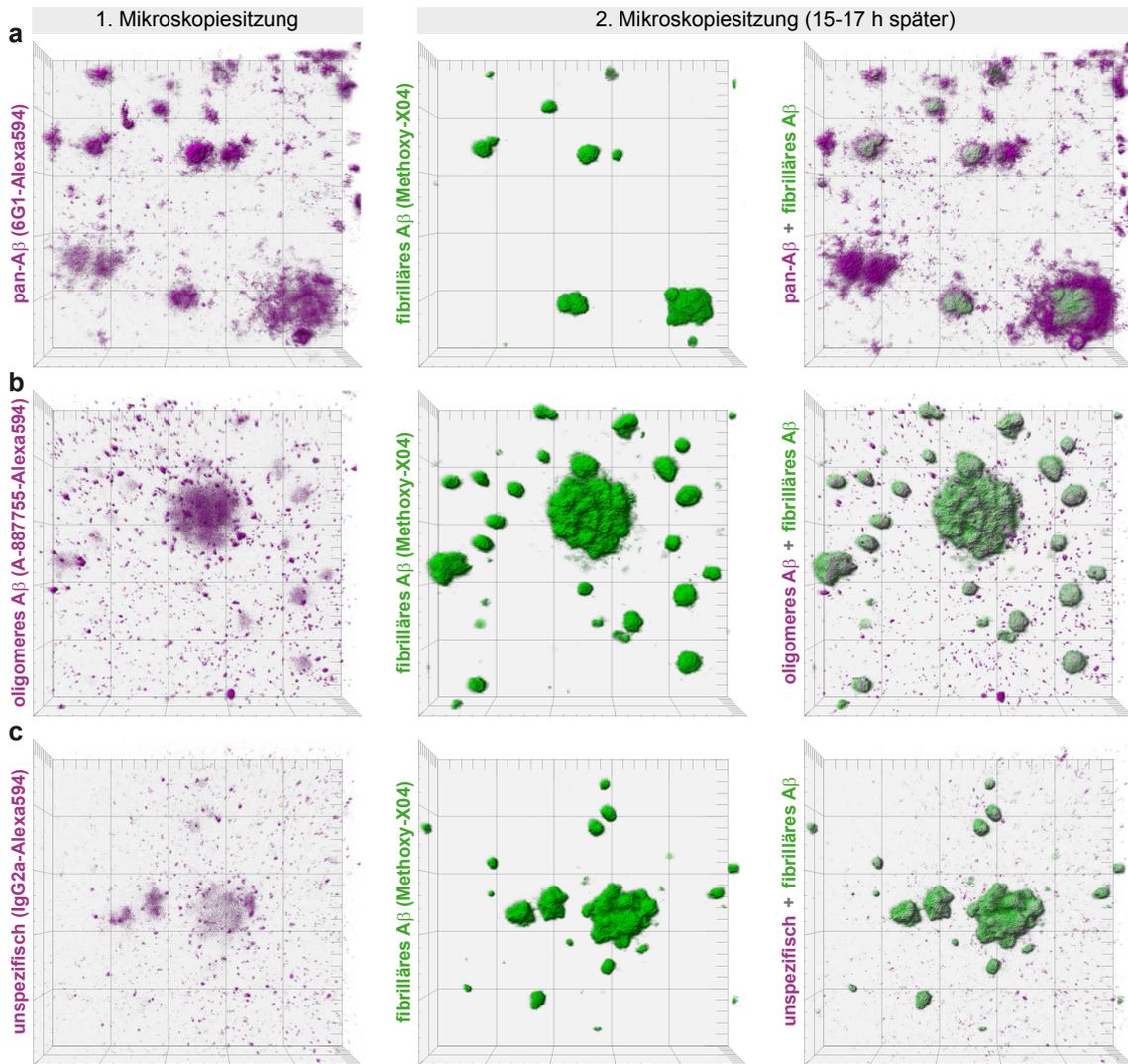


Abb. 2.24: In vivo Markierung verschiedener A β -Aggregate im zerebralen Cortex. Für die *in vivo* Markierung der verschiedenen A β -Aggregate wurden die Antikörper aus dem Behandlungsversuch verwendet, die chemisch an den Alexa594 Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurden (**a** pan-A β erkennend 6G1, **b** oligomeres A β erkennend A-887755, **c** unspezifische Isotypkontrolle IgG2a). Zur Detektion amyloider Plaques wurde der Fluoreszenzfarbstoff Methoxy-X04 eingesetzt. Die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden als dreidimensionale Volumen-gerenderte Bilder dargestellt (Antikörper magenta, amyloide Plaques grün). Die fluoreszenzmarkierten Antikörper (0,3 mg/ml) wurden direkt auf die Gehirnoberfläche nach Entfernung der Dura Mater appliziert. Anschließend wurde das kraniale Fenster mit dem Glas verschlossen. Nach fünf bis sechs Stunden Inkubationszeit fand die erste Mikroskopisierung statt. Direkt danach wurde Methoxy-X04 intraperitoneal appliziert, um die amyloiden Plaques zu markieren. 15 bis 17 Stunden später wurden beide Signale (Antikörper und Plaques) gemeinsam in einer zweiten Mikroskopisierung detektiert. Der Maßstab repräsentiert 50 μ m.

im Vergleich zu dem erwartenden Signal der löslichen A β -Moleküle sehr stark war, wurde eine sequentielle Färbestrategie angewendet. Bei der Implantation des kranialen Fensters wurde die Dura Mater entfernt und eine Lösung der fluoreszenzmarkierten Antikörper ($0,3 \text{ mg ml}^{-1}$) direkt auf die Gehirnoberfläche gegeben. Die Öffnung im Schädel der Maus wurde mit einem Deckglas verschlossen. Um den Antikörper in das Gehirn diffundieren zu lassen, wurde mit der ersten Mikroskopiesitzung fünf bis sechs Stunden nach der Operation begonnen. In Abbildung 2.24 auf der vorherigen Seite wurden repräsentative Beispiele als dreidimensionale Volumengerechtere Bilder dargestellt. Für jeden Antikörper war eine Plaque-ähnliche Akkumulation zu detektieren. Das Signal für den pan-A β Antikörper 6G1 war mit Abstand am stärksten, gefolgt von dem Signal des A β -Oligomer-spezifischen Antikörpers A-887755. Für die Isotypkontrolle wurde ebenfalls eine Akkumulation detektiert, deren Signal am schwächsten war. Für eine Färbung der amyloiden Plaques wurde nach der ersten Mikroskopiesitzung Methoxy-X04 (2 mg kg^{-1}) intraperitoneal injiziert. Nach 15 bis 17 Stunden Inkubationszeit wurde die zweite Mikroskopiesitzung zur Messung beider Fluorophore begonnen. In Abbildung 2.24 sind die Bilder der gleichen Positionen wie in der ersten Mikroskopiesitzung zu sehen. Der pan-A β Antikörper 6G1 zeigte eine komplette Kolokalisation mit den amyloiden Plaques und färbte meist auch eine Korona um den Plaque an. Zudem waren Akkumulationen zu sehen, die keinen amyloiden Kern anfärbten (Abb. 2.24 a). Der A β -Oligomer-spezifische Antikörper und die Isotypkontrolle zeigten ebenfalls eine komplette Kolokalisation mit den amyloiden Plaques. In diesen Bildern waren keine Koronen um die Plaques zu erkennen, sondern eine klare Abgrenzung, wie sie die amyloiden Plaques selbst aufwiesen (Abb. 2.24 b und c).

Kapitel 3

Diskussion

3.1 Differentielle Effekte der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines im somatosensorischen Cortex

Die Pathologie des Morbus Alzheimer ist gekennzeichnet durch die Akkumulation des A β -Peptids und den daraus entstehenden Aggregaten, die sich zu amyloiden Plaques formieren (Selkoe, 2001). Ein zweites charakteristisches Merkmal der Krankheit ist die Hyperphosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, die zur Aggregation des Proteins im Zellkörper von Neuronen in Form von Tangles führt (Duyckaerts u. a., 2009). In der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde postuliert, dass die Akkumulation des A β -Peptids das primäre Ereignis in der Ätiologie der Krankheit darstellt (Hardy u. a., 1991). Die ersten kognitiven Einschränkungen während der Erkrankung wurden auf synaptische Defizite zurückgeführt, die hauptsächlich durch diffundierende und synaptotoxische A β -Oligomere hervorgerufen werden (Selkoe, 2002).

Zur Testung von therapeutischen Strategien, die auf dieser Hypothese basieren, wurde die transgene Mauslinie Tg2576 ausgewählt. Dieses Mausmodell ist durch eine altersabhängige Akkumulation des A β -Peptids aufgrund der Überexpression eines humanen Amyloid-Vorläuferproteins (APP) mit der schwedischen Mutation unter einem neuronalen Promotor charakterisiert (Hsiao u. a., 1996). Die Untersuchung der Dichte dendritischer Spines wurde in einem Alter von zwölf Monaten durchgeführt, in dem bereits lösliche A β -Peptide und unlösliche A β -Aggregate im Gehirn akkumulierten (Apelt u. a., 2004; Kawarabayashi u. a., 2001). Zudem waren in diesem Alter A β -Oligomere im Gehirn der transgenen Mäuse nachzuweisen (Barghorn u. a., 2005). Die Dichte der amyloiden Plaques war mit zwölf Monaten noch relativ gering, sodass die Untersuchung der synaptotoxischen Wirkung von A β -Oligomeren auf die Dichte dendritischer Spines in einem Mindestabstand von 50 μm (meist wesentlich weiter entfernt) zu amyloiden Plaques durchgeführt werden konnte. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie durch ein kraniales Fenster über dem zerebralen Cortex wurden einzelne dendritische Spines über mehrere Wochen verfolgt. Zur Markierung von Dendriten, Axonen und dendritischen Spines wurde eine Mauslinie eingekreuzt, die in einem Teil der pyramidalen Schicht II/III und V Neurone das fluoreszierende Protein YFP exprimiert (Feng u. a., 2000). Der Vorteil dieser *in vivo* Technik war die Möglichkeit der direkten Verlaufskontrolle des Therapieeffekts, da die Therapie aufgrund der langsam fortschreitenden Prozesse meist

3.1 Effekt der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins auf die Spinedichte in vivo

mehrere Wochen bis Monate dauern kann (Jucker, 2010). Durch diesen experimentellen Aufbau sollte eine robuste Methode zur präklinischen Testung verschiedener Therapeutika etabliert werden, um diese hinsichtlich ihrer Wirkung auf synaptische Defizite zu untersuchen.

3.1.1 Schicht II/III Neurone zeigen keine Unterschiede in der Spinedichte

Für die apikalen Dendriten der Schicht II/III Neurone wurde eine Spinedichte von ungefähr $0,3 \mu\text{m}^{-1}$ gemessen (Abb. 2.2 b, auf Seite 31). Durch die Überexpression von APP konnte kein signifikanter Unterschied und kein Trend zu einer niedrigeren Spinedichte festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde in drei Publikationen von einer reduzierten Spinedichte berichtet (Alpár u. a., 2006; K. J. Lee u. a., 2010; Rocher u. a., 2008). Rocher u. a. (2008) berichteten weiterhin, dass die absolute Anzahl dendritischer Spines im Gegensatz zur Spinedichte nicht unterschiedlich war. Ein deutlicher Unterschied zwischen allen Studien waren die verschiedenen Methoden zur Färbung der neuronalen Baumstruktur. Es wurden eine klassische Golgi-Färbung (K. J. Lee u. a., 2010), eine Färbung durch direkte Injektion von Biocytin (Rocher u. a., 2008) und eine retrograde Färbung durch die Injektion von biotinyliertem Dextran-Amin in das Corpus Callosum (Alpár u. a., 2006) mit jeweils anschließender Detektionsreaktion angewandt. Die gemessenen Spinedichten für die Wildtyp-tiere variierten sehr stark mit Werten von $0,5 \mu\text{m}^{-1}$ (Alpár u. a., 2006), $1,3 \mu\text{m}^{-1}$ (Rocher u. a., 2008) und $0,7 \mu\text{m}^{-1}$ (K. J. Lee u. a., 2010). Mögliche Gründe für diese sehr großen Abweichungen in den Spinedichten könnten die Färbemethoden und die daraus resultierende Markierung unterschiedlicher Subtypen von Schicht II/III Neuronen sein. Ein Indiz für diese Erklärung gaben die untersuchten Längen der apikalen Dendriten in der Sholl-Analyse, bei der die Spinedichten in Abhängigkeit zum Abstand vom Zellkörper bestimmt wurden (Sholl, 1953). Die Spinedichten wurden bis zu einer Entfernung von $100 \mu\text{m}$ (Alpár u. a., 2006) und $550 \mu\text{m}$ (Rocher u. a., 2008) vom Zellkörper gemessen. Eine weitere Erklärung für die Unterschiede in den Spinedichten waren die genetischen Hintergründe der verwendeten Mauslinien. In der Originalpublikation wurden die transgenen Tiere heterozygot auf einem B6/SJL Mischhintergrund gezüchtet (Hsiao u. a., 1996). Aufgrund der Einkreuzung der YFP-H Mauslinie in die Tg2576 Mauslinie änderte sich der genetische Hintergrund der Tochtergeneration, da die YFP-H Mauslinie auf einer reinen C57BL/6 Inzuchtlinie basierte (Feng u. a., 2000). Die Einkreuzung verschiedener genetischer Hintergründe in die Tg2576 Mauslinie wurde bereits mit abweichenden Ergebnissen

in Verhaltensstudien in Verbindung gebracht (Lassalle u. a., 2008). In einem anderen Alzheimer-Mausmodell mit zwei Transgenen wurden ebenfalls Unterschiede im Verlauf der Pathologie und in Verhaltenstests aufgrund unterschiedlicher genetischer Hintergründe festgestellt (Couch u. a., 2013). Ein Vergleich von zwei reinen Inzuchtlinien zeigte auch deutliche Unterschiede in der kognitiven Leistung (Deacon u. a., 2007).

3.1.2 Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins führt zu einer erhöhten Spinedichte in Schicht V Neuronen

Die Überexpression des APP führte an apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen zu einer erhöhten Spinedichte im Vergleich zu Wildtyptieren im Alter von zwölf Monaten (2.2 c, auf Seite 31). Ein direkter Vergleich in der Literatur existierte nicht für das Tg2576 Mausmodell in diesem Alter. In acht bis zehn Monate alten Tg2576 Tieren wurde kein Unterschied in der Spinedichte apikaler Dendriten zwischen transgenen Mäusen und Wildtyptieren *in vivo* gemessen (Spires-Jones u. a., 2007). Interessanterweise waren die Spinedichten der Wildtyptiere im Alter von zwölf Monaten mit $0,3 \mu\text{m}^{-1}$ in beiden Studien gleich. Für 21 bis 24 Monate alte Tg2576 Mäuse wurde eine Reduktion der Spinedichte berichtet, während die Spinedichte der Wildtyptiere sich nicht über die Zeit änderte (Spires u. a., 2005). Die in der vorliegenden Arbeit gemessene erhöhte Spinedichte von $0,35 \mu\text{m}^{-1}$ in Tg2576xYFP Mäusen stand in Diskrepanz zu den beiden genannten Studien. Sie konnte nicht allein durch die unterschiedlichen Altersgruppen erklärt werden. In diesem Fall wäre auch eine erhöhte Spinedichte für acht bis zehn Monate alte Tg2576 zu erwarten. Eine möglicherweise altersabhängige Reduktion der Spinedichte, wie sie aus der Untersuchung von 21 bis 24 Monate alten Tg2576 geschlossen werden kann (Spires u. a., 2005), konnte in der kinetischen Messung der Spinedichte über sechs Wochen nicht detektiert werden (Abb. 2.4 a, auf Seite 33). In beiden Studien wurde nicht genau spezifiziert, von welchen Neuronen die Spinedichten der apikalen Dendriten bestimmt wurden (Spires u. a., 2005; Spires-Jones u. a., 2007). Zur Fluoreszenzmarkierung der Neurone wurde eine intrakortikale Injektion eines Adeno-assoziierten Virus verwendet, der die Gensequenz zur Expression eines „enhanced“ grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) enthielt. Beide versuchstechnischen Unterschiede könnten eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zu den Daten dieser Arbeit darstellen, da hier die Neuronentypen genau spezifiziert werden konnten. In einer weiteren *in vivo* Studie wurden keine Unterschiede der Spinedichte zwischen der YFP-H Mauslinie und APPPS1xYFP-H

3.1 Effekt der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins auf die Spinedichte in vivo

Mauslinie in einem Abstand größer 50 μm von amyloiden Plaques gemessen (Bittner u. a., 2012). Die möglichen Gründe waren die zusätzliche Überexpression eines mutierten Präsenilin 1 und die fehlende Unterscheidung der Dendriten von Schicht II/III und Schicht V Neuronen.

Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Funktionen des APP und dessen proteolytische Fragmente diskutiert, die für die erhöhte Spinedichte in den apikalen Dendriten der Schicht V Neurone verantwortlich sein könnten. APP wurde unter anderem in den Membranen synaptischer Präparationen detektiert (Kirazov u. a., 2001) und wurde in weiteren Studien im prä- und postsynaptischen Kompartiment, in Dendriten und in Axonen lokalisiert (Hoe u. a., 2009; Koo u. a., 1990; Lyckman u. a., 1998; Schubert u. a., 1991; Shigematsu u. a., 1992; Sisodia u. a., 1993; Turner u. a., 2003; Yamazaki u. a., 1995). Zusätzlich wurde der extrazellulären Domäne des APP eine wichtige Funktion zur Förderung der Bildung neuer Synapsen zugeschrieben (Z. Wang u. a., 2009). Diese Studien lassen den Schluss zu, dass durch transsynaptische Interaktionen zwischen prä- und postsynaptischem APP zur Adhäsion von Synapsen beitragen (Hoe u. a., 2012; Z. Wang u. a., 2009). Interessanterweise war die erhöhte Spinedichte der Schicht V Neurone auf eine höhere Dichte persistenter Spines zurückzuführen (Abb. 2.4 b auf Seite 33). Es ist denkbar, dass dieser Synapsen-stabilisierende Effekt durch die Überexpression von APP und der daraus resultierenden erhöhten Adhäsion zwischen Prä- und Postsynapse verursacht wurde. Im Gegensatz dazu wurde über den gesamten Mikroskopiezeitraum keine Änderung der Dichte transienter Spines detektiert, d.h. die Mechanismen zur Formierung und Eliminierung dendritischer Spines waren unbeeinflusst. Diese strukturelle Plastizität ist für die Prozesse des Lernens und Gedächtnisses notwendig, um neue Verschaltungen im neuronalen Netzwerk zu realisieren (Caroni u. a., 2012; Fu u. a., 2011).

Interessanterweise wurde in zwei unabhängigen Studien gezeigt, dass eine visuelle, sensorische und motorische Stimulation durch ein „enriched environment“ sowohl zu einer erhöhten Expression von APP (Huber u. a., 1997) als auch zu einer erhöhten Spinedichte in Schicht II/III und V Neuronen im somatosensorischen Cortex führt (C. K. E. Jung u. a., 2012b). Ein „enriched environment“ stellt eine im Vergleich zu einer Standard-Haltung stimulierende Umgebung dar, die meist aus einem größeren Käfig besteht, in dem Spielzeuge, Leitern, Tunnel, Brücken, Laufräder und kleine Häuser platziert sind (Rampon u. a., 2000). Zudem trägt eine Haltung in Gruppen zur weiteren Stimulation durch soziale Kontakte bei. Diese Art der Haltung beeinflusste die Cholinesteraseaktivität und resultierte in einem größerem Gehirnvolumen

durch eine Erhöhung der Dicke des zerebralen Cortex und in einer erhöhten Anzahl von Synapsen und Gliazellen (Altman u. a., 1964; Diamond u. a., 1964, 1966; Krech u. a., 1960; Rosenzweig u. a., 1962). Wenn ein „enriched environment“ sowohl zu einer erhöhten Expression von APP (Huber u. a., 1997) als auch zu einer Spinedichte im somatosensorischen Cortex führte (C. K. E. Jung u. a., 2012b), könnte dies eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gemessene erhöhte Spinedichte durch transgene Überexpression von APP sein.

Im Zusammenhang mit der Überexpression von APP wurde eine verstärkte Rekrutierung von NMDA-Rezeptoren zur postsynaptischen Dichte berichtet, die vor allem die NR2B Untereinheit des Rezeptors beinhaltet (Hoe u. a., 2009, 2012). Die Überexpression der NR2B Untereinheit führte ihrerseits zu einer Verstärkung der Langzeit-Potenzierung (LTP, eng.: long-term potentiation) in transgenen Mäusen (Y. P. Tang u. a., 1999, 2001). Weiterhin wurde für diese Mäuse eine Verbesserung des Gedächtnisses zur sozialen Wiedererkennung beschrieben (Jacobs u. a., 2012). LTP ist die langlebige Verstärkung der Signaltransmission zwischen zwei Neuronen, die durch synchrone Stimulation entsteht (Bliss u. a., 1993, 1973a,b; Ho u. a., 2011). Es ist eine Form der synaptischen Plastizität, die Fähigkeit einer chemischen Synapse ihre Stärke zu verändern. Diese Eigenschaft wird als Grundlage von Lernen und Gedächtnis angenommen, weshalb LTP als ein bedeutender zellulärer Mechanismus beim Lernen und Gedächtnis betrachtet wird (Bliss u. a., 1993; Cooke u. a., 2006; Lynch, 2004). Die Aufrechterhaltung von LTP ist notwendig für die Stabilisierung dendritischer Spines über die Zeit (Bhatt u. a., 2009; Caroni u. a., 2012; Fu u. a., 2011; Hill u. a., 2013; Knott u. a., 2008, 2006; Segal, 2005; Zito u. a., 2009). Im Hinblick auf die kinetische Untersuchung wurden aufgrund der Überexpression von APP mehr persistente Spines detektiert, die über längere Zeiträume stabil waren (Abb. 2.4 b auf Seite 33). Weiterhin können durch Induktion von LTP neue Spines entstehen, was eine mögliche Erklärung der erhöhten Spinedichte darstellt (Engert u. a., 1999; Yuste, 2009; Yuste u. a., 2001a). Auch die Morphologie der dendritischen Spines kann sich durch diese Art der Stimulation verändern und zu einem vergrößerten Spinekopf führen (Lippman u. a., 2005; Matsuzaki u. a., 2004; Tada u. a., 2006; Yuste, 2009). Eine Veränderung der Verteilung der morphologischen Klassen von Spines, „thin“, „mushroom“ und „stubby“, die auf eine Änderung der Spinegeometrie zurückzuführen wäre, wurde nicht gemessen (Abb. 2.5 auf Seite 34).

Für das A β -Peptid wurde kürzlich eine Rolle als Modulator von LTP beschrieben, mit einer verstärkenden Wirkung in picomolaren Konzentrationen und einer

3.1 Effekt der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins auf die Spinedichte in vivo

unterdrückenden Wirkung in nanomolaren Konzentrationen (Puzzo u. a., 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass das A β -Peptid für die synaptische Plastizität notwendig ist (Puzzo u. a., 2013, 2011). Dies ist eine weitere mögliche Erklärung der erhöhten Spinedichte aufgrund der Überexpression von APP und der daraus resultierenden erhöhten Konzentration an A β -Peptiden.

3.1.3 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden differentielle Effekte der Überexpression von APP auf die Spinedichte gezeigt. Im Mausmodell wiesen die apikalen Dendriten der Schicht II/III Neuronen die gleiche Spinedichte wie in Wildtyptieren auf, während die Spinedichte der Schicht V Neurone erhöht war. Interessanterweise resultierte die erhöhte Spinedichte in Schicht V Neuronen aus einer größeren Dichte langlebiger Spines. Weiterhin wurden über den Beobachtungszeitraum von sechs Wochen keine Änderungen der Spinedichte und keine Unterschiede in der Spinemorphologie festgestellt.

Mögliche Gründe für diesen differentiellen Effekt auf die Spinedichte könnten unterschiedliche Expressionsspiegel von APP in den beiden Neuronentypen sein. Außerdem ist eine unterschiedliche Empfindlichkeit auf die Auswirkungen der Überexpression von APP denkbar. Die erhöhte Spinedichte in Schicht V Neuronen war ein unerwartetes und erstaunliches Ergebnis, da das Tg2576 Mausmodell im untersuchten Alter von zwölf Monaten bereits deutlich erhöhte Mengen an löslichem und unlöslichem A β -Peptid, sowie A β -Oligomeren im Vergleich zu Wildtyptieren produziert hat (Apelt u. a., 2004; Barghorn u. a., 2005; Kawarabayashi u. a., 2001). Mögliche positive Effekte durch die Überexpression von APP, die im Zusammenhang mit diesem Ergebnis stehen könnten, wurden in dem vorherigen Abschnitt diskutiert. Weiterhin wurde in mehreren Studien von einer Reduktion der Spinedichte im Hippocampus berichtet. Die Spinedichten der apikalen Dendriten von CA1 pyramidalen Neuronen waren ab einem Alter von drei bis vier Monaten reduziert im Vergleich zu Wildtyptieren (Adlard u. a., 2011; D'Amelio u. a., 2011; Lanz u. a., 2003). Im Gegensatz hierzu wurden keine Unterschiede der Spinedichten der basalen Dendriten dieser Neurone detektiert (Adlard u. a., 2011; D'Amelio u. a., 2011). Perez-Cruz u. a. (2011) zeigten ein gegenteiliges Ergebnis im Alter von fünf Monaten, indem die Spinedichten von basalen proximalen Dendriten reduziert und die Spinedichten der apikalen Dendriten unverändert waren. Im Gyrus Dentatus wurde eine Reduktion der Spinedichte ab einem Alter von vier Monaten gemessen (Jacobsen u. a., 2006). Diese pathologischen Befunde waren sehr spezifisch und nicht kon-

sistent zwischen den Studien, was an unterschiedlichen Methoden oder genetischen Hintergründen der Mauslinien liegen könnte (C. K. E. Jung u. a., 2012a). Zudem muss bei der Untersuchung mit drei Monaten der entwicklungsbiologische Aspekt von APP mit in die Betrachtung einbezogen werden (Herms u. a., 2004; Wolfe u. a., 2007). Ein wichtiger Grund für dieses sehr heterogene Bild der Phänotypen war sehr wahrscheinlich eine Überlagerung verschiedener Effekte durch die Überexpression von APP und der daraus entstehenden größeren Mengen an proteolytischen Fragmenten zu den unterschiedlichen Altern der untersuchten Tiere.

3.2 In vivo Wachstumskinetik amyloider Plaques

Als ein charakteristisches Merkmal von Morbus Alzheimer wurde in der vorliegenden Arbeit die Aggregation des A β -Peptids zu amyloiden Plaques im Tg2576 Mausmodell *in vivo* untersucht. Die biophysikalischen Grundlagen der Aggregationskinetik des A β -Peptids wurden in *in vitro* Studien erforscht. Der initiale Prozess der Aggregation ist von der Bildung eines Aggregationskeimes abhängig. Weiterhin korreliert die Bildungswahrscheinlichkeit eines Aggregationskeimes mit der Konzentration des A β -Peptids. Die Phase der Keimbildung kann durch die Zugabe von exogenen Aggregationskeimen verkürzt oder überbrückt werden. In Experimenten mit einer Dauer von Stunden bis zu mehreren Tagen wurde gezeigt, dass der Verlauf der Aggregationskinetik einer Sigmoid-Funktion folgt. Dabei wurden drei Phasen unterschieden: (1) eine Phase der Verzögerung, aufgrund der niedrigen Wahrscheinlichkeit der Aggregationskeimbildung (2) eine exponentielle Wachstumsphase und (3) eine Phase des Äquilibrium in der kein weiteres Wachstum messbar ist (siehe Abschnitt 1.2.3 auf Seite 11). In dieser Studie wurde die Aggregationskinetik amyloider Plaques im intakten Gehirn eines Alzheimer-Mausmodells über mehrere Wochen bis über ein Jahr in verschiedenen Altersgruppen untersucht. Dabei wurde die Zwei-Photonen-Mikroskopie in Kombination mit der Implantation eines kranialen Fensters angewendet. Die Verbindung beider Techniken ermöglichte die Untersuchung der selben Gehirnregionen über lange Zeiträume und die Beobachtung tief im Gewebe.

3.2.1 Der erste Nachweis eines stetigen Plaquewachstums

Eine erste Auswertung des Plaquevolumens über die Zeit ergab eine messbare Größenzunahme bereits nach einer Woche, die sich über den Beobachtungszeitraum von sechs Wochen weiter fortsetzte (Abb. 2.7 d auf Seite 36). Dieses Ergebnis stand

in Kontrast zu dem von Meyer-Luehmann u. a. (2008) postulierten Modell, dass amyloide Plaques innerhalb eines Tages in ihrer finalen Größe erscheinen. P. Yan u. a. (2009) beobachteten ebenfalls ein langfristiges Wachstum von präexistenten Plaques in dem APP^{swe}/PS1^{dE9} Mausmodell (Jankowsky u. a., 2004; Savonenko u. a., 2005). Neben den präexistenten Plaques wurden neu entstandene Plaques untersucht, deren Größe auch stetig zunahm (Abb. 2.7 a auf Seite 36). Eine weitere Arbeitsgruppe publizierte praktisch zeitgleich übereinstimmende *in vivo* Ergebnisse für präexistente und neu entstandene Plaques in dem APP^{PS1} Mausmodell (Burgold u. a., 2011; Hefendehl u. a., 2011; Radde u. a., 2006). Dieser Befund wurde zusätzlich durch Daten gestützt, die mit einer Art Zeitstempelmethode durch sequentielle Färbung der amyloiden Plaques mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen generiert wurden (Condello u. a., 2011).

Für die Diskrepanz zu den Daten von Meyer-Luehmann u. a. (2008) könnten verschiedene technische Aspekte verantwortlich sein. Ein kritischer Punkt war die Verwendung des Plaquevolumens als Größenmaß, da die dreidimensionale Auflösung in der optischen Mikroskopie nicht isotrop ist (Denk u. a., 1997; Helmchen u. a., 2005). Aus diesem Grund wurden die Plaqueflächen aus Maximumintensitätsprojektionen der dreidimensionalen Bilder als Größenmaß analysiert, da in dieser Ebene die Auflösung größer ist als entlang der optischen Achse des Objektivs. Die Analyse zeigte das gleiche stetige Wachstum der neu entstandenen und präexistenten Plaques wie die Auswertung der Plaquevolumina (Abb. 2.7 b, e auf Seite 36). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da von zwei unterschiedlichen Laboren ein langfristiges Wachstum amyloider Plaques berichtet wurde, die auch eine quantitative Auswertung der Plaqueflächen durchführten (Condello u. a., 2011; P. Yan u. a., 2009). Ein wesentlicher Unterschied war, dass in der vorliegenden Studie mindestens eine dreiwöchige Erholungsphase nach der Implantation des kranialen Fensters eingelegt wurde, während Meyer-Luehmann u. a. (2008) direkt nach der Operation mit dem Mikroskopieren startete. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde eine weitere Gruppe im gleichen Zeitschema mikroskopiert, wie es Meyer-Luehmann u. a. (2008) angewandt hat. Diese Analyse zeigte ebenfalls ein stetiges Wachstum nach zehn Tagen (Abb. 2.7 c, f auf Seite 36).

3.2.2 Charakterisierung der Immunreaktion unter dem kranialen Fenster

Durch die Öffnung der Schädeldecke bei der Implantation des kranialen Fensters kann eine Immunreaktion im Gehirn ausgelöst werden, die unter anderem den Um-

satz dendritischer Spines und das Plaquewachstum beeinflussen könnten (H.-T. Xu u. a., 2007; P. Yan u. a., 2009). Da diese Operation ein diffiziler Eingriff ist, dessen Erfolg stark vom Operateur und den jeweiligen Laborbedingungen abhängt (Holtmaat u. a., 2009; Keck u. a., 2008), wurde die Aktivierung von Gliazellen unter dem kranialen Fenster quantifiziert. Zwei Tage nach der Operation zeigte sich eine akute Aktivierung der Mikroglia, die durch eine Erhöhung des Volumens der Zellkörper (Abb. 2.8 c auf Seite 38) und eine reduzierte Komplexität der Fortsätze gekennzeichnet war (Boche u. a., 2013; Lynch, 2009; Stence u. a., 2001; Streit u. a., 1999). Zusätzlich war die Dichte der Mikroglia deutlich reduziert (Abb. 2.8 b). Die Morphologie ruhender Mikroglia wurde bereits nach zehn Tagen wieder erreicht (Davalos u. a., 2005; Kettenmann u. a., 2011; Nimmerjahn u. a., 2005), was sich in einem normalisierten Zellvolumen widerspiegelte. Interessanterweise war zu diesem Zeitpunkt die Mikrogliaadichte deutlich erhöht, was auf eine zweite verzögerte Phase der Mikrogliaaktivierung schließen ließ. Die größte Zelldichte wurde direkt unter dem kranialen Fenster mit einem abnehmenden Gradienten in größerem Abstand zur Gehirnoberfläche gemessen. Nach der normalerweise eingehaltenen Erholungsphase von drei Wochen war die Morphologie, die Dichte und das Volumen der Mikroglia nicht mehr unterschiedlich zur kontralateralen Seite mit intaktem Schädelknochen.

Die Untersuchung der Astrozyten wurde mittels Immunfärbung gegen GFAP durchgeführt, das einen spezifischen Marker für den Aktivierungsgrad dieser Zellen darstellt (O’Callaghan, 1993, 1994; O’Callaghan u. a., 2005; Weber u. a., 2013). Zehn Tage nach der Operation war die Dichte aktivierter Astrozyten unter dem kranialen Fenster erhöht, während auf der kontralateralen Seite zu keinem Zeitpunkt GFAP-positive Astrozyten detektiert wurden (Abb. 2.8 c auf Seite 38). Die Astrozytendichte unterlag sehr starken Schwankungen und es waren zu allen drei Zeitpunkten aktivierte Astrozyten unter dem kranialen Fenster vorhanden. Innerhalb der ersten zehn Tage nach Operation war ein Gradient der Astrozytendichte mit höheren Werten direkt an der Gehirnoberfläche zu verzeichnen. Dieser Gradient war nach drei Wochen nicht mehr zu erkennen und das Gesamtniveau war etwas niedriger. Das mittlere Volumen der aktivierten Astrozyten war zu jedem Zeitpunkt gleich.

Die Immunreaktion nach Implantation eines kranialen Fensters war durch eine akute Aktivierung von Mikroglia in Form von morphologischen Veränderungen und einer Reduktion der Zelldichte gekennzeichnet. In einer verzögerten zweiten Phase war die Mikrogliaadichte erhöht, während sich die Morphologie nicht von ruhen-

den Mikroglia unterschied. Nach drei Wochen Erholungsphase waren alle Aktivierungsmerkmale komplett abgeklungen. Dagegen entwickelte sich die Aktivierung von Astrozyten langsamer und erreichte den Höhepunkt erst zehn Tage nach der Operation. Am Ende der Erholungsphase war die Reaktion der Astrozyten bereits vermindert.

3.2.3 Die Immunreaktion beeinflusst das Plaquewachstum

In mehreren Studien wurde die Aktivierung von Mikroglia mit einer reduzierten Ablagerung von β -Amyloid assoziiert (Gentleman, 2013; D. C. Lee u. a., 2013). Es wurde gezeigt, dass die Implantation eines kranialen Fensters zur Aktivierung von Mikroglia innerhalb der ersten drei Wochen nach Operation führte. Das Wachstum präexistenter Plaques in diesem Zeitraum war langsamer im Vergleich zu Daten, deren Aufnahme erst im Anschluss an die dreiwöchige Erholungsphase nach der Operation begonnen wurde. P. Yan u. a. (2009) berichteten von einem kompletten Stillstand des Wachstums innerhalb der ersten vier Wochen nach Operation. Als Grund wurde die Aktivierung von Mikroglia durch die Öffnung der Schädeldecke aufgeführt, während mit einer anderen Präparationstechnik ohne Öffnung der Schädeldecke Plaquewachstum detektiert wurde. Bei dieser Präparationstechnik wurde der Schädelknochen lediglich bis auf ungefähr 25 μm ausgedünnt, wodurch keine Immunreaktion hervorgerufen wurde (H.-T. Xu u. a., 2007; Yang u. a., 2010). Eine Aktivierung von Mikroglia mittels intrakortikaler Injektion von Interferon- γ (IFN- γ) oder durch Überexpression von Interleukin-1 β (IL-1 β) führte zu einem verminderten Plaquewachstum (Garcia-Alloza u. a., 2007b; Ghosh u. a., 2013; Matousek u. a., 2012). Weiterhin wurde die Assoziation von Mikroglia mit amyloiden Plaques beschrieben und deren Rolle beim Abbau und der Internalisierung von β -Amyloid (El Khoury u. a., 1996; Paresce u. a., 1996). Eine verstärkte Plaquebildung wurde beobachtet, wenn die Akkumulation von Mikroglia um die amyloiden Plaques supprimiert wurde, zum Beispiel durch die Defizienz des Chemokinrezeptors CCR2 (El Khoury u. a., 2007). Für die Rolle von Mikroglia in der Entwicklung amyloider Plaques gab es auch kontroverse Ergebnisse: so wurde in kompletter Abwesenheit von Mikroglia kein Unterschied des Plaquewachstums festgestellt (Grathwohl u. a., 2009). Im Fall einer erhöhten Akkumulation von Mikroglia um amyloide Plaques wurde eine langsamere Plaquebildung beobachtet, was mit einer erhöhten Phagozytose von β -Amyloid begründet wurde (S. Lee u. a., 2010; Z. Liu u. a., 2010; Prinz u. a., 2011). Die Ergebnisse aus diesen Studien legen den Schluss nahe, dass die

in der vorliegenden Arbeit gemessene, verminderte Plaquewachstumsgeschwindigkeit innerhalb der ersten drei Wochen nach Operation sehr wahrscheinlich aus einer erhöhten Phagozytose der Mikroglia resultierte. Diese waren in den ersten Tagen nach der Operation akut aktiviert und folglich stieg die Dichte der Mikroglia an, was beides zu einer erhöhten Phagozytoseleistung führen könnte.

Interessanterweise wurde für neu entstandene Plaques ein schnelleres Wachstum während der Mikrogliaaktivierung gemessen im Vergleich zur Gruppe, deren Datenerhebung erst nach der normalen dreiwöchigen Erholungsphase im Anschluss an die Operation begonnen wurde (Abb. 2.8 a, c auf Seite 38). Zu diesem Teilversuch gab es keine Vergleichsdaten in der Literatur, da in den meisten Publikationen die prozentuale Beladung des Gehirns mit amyloiden Plaques als Größenmaß verwendet wurde. Dadurch konnten neu entstandene und präexistente Plaques nicht unterschieden werden. Zudem war der Anteil der neu entstandenen Plaques an der Gesamtmasse aller Plaques, aufgrund ihrer geringen Größe, sehr klein. Eine Änderung dieses kleinen Anteils war mit dieser Methode praktisch nicht messbar. In einer noch unveröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Mikroglia zum Ort der Entstehung von neuen Plaques mehrere Wochen dauern kann. Die unterschiedlichen Beobachtungszeiträume von drei und sechs Wochen könnten dazu führen, dass in der einen Gruppe Plaques in Abwesenheit und in der anderen Gruppe in Anwesenheit von Mikroglia zumindest für einen Teil des Beobachtungszeitraumes wuchsen. Solange sich die Mikroglia nicht in räumlicher Nähe zu den Plaques befinden, können sie keine Phagozytose und damit keine Limitierung des Plaquewachstums bewirken. Möglicherweise war die Rekrutierung der Mikroglia zu neu entstandenen Plaques durch die Entzündungsreaktion auch direkt beeinflusst.

Die Implantation eines kranialen Fensters führte zu einer deutlichen Reduktion des Plaquewachstums innerhalb der ersten drei Wochen nach Operation. Dieses Ergebnis lieferte eine logische Begründung für mehrere Studien, in denen kein stetiges Plaquewachstum gemessen wurde (Bacsikai u. a., 2001, 2002; Garcia-Alloza u. a., 2007a,b, 2006, 2009; Meyer-Luehmann u. a., 2008). In diesen Studien wurde direkt nach der Implantation des kranialen Fensters mit der Messung des Plaquewachstums über eine Dauer von maximal drei Wochen begonnen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aktivierung der Mikroglia nach der üblicherweise eingehaltenen Erholungsphase von drei Wochen im Anschluss an die Operation komplett abgeklungen war. Sowohl der morphologische Phänotyp als auch die Mikroglia-dichte waren nach drei Wochen normalisiert. Die Astrozytenaktivierung begann etwas verzögert und war nach drei

Wochen bereits am Abklingen. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Einhaltung einer Erholungsphase von drei Wochen nach der Operation für eine Normalisierung des Immunstatus ausreichend, aber nötig war und sich diese Methode zur Messung der Plaquewachstumskinetik eignete.

3.2.4 Eine detaillierte Beschreibung der in vivo Plaquewachstumskinetik

In einem zweiten Experiment wurde die altersabhängige Entwicklung amyloider Plaques in zwei verschiedenen Altersgruppen über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten untersucht. Die erste Gruppe wurde ab einem Alter von zwölf Monaten mikroskopiert. Da die amyloide Pathologie in dem Tg2576 Mausmodell erst mit neun bis zehn Monaten begann und langsam fortschritt, stellte dieser Zeitpunkt ein sehr frühes Stadium dar. Zwei der vier Mäuse aus dieser Gruppe konnten über sechs Monate mikroskopiert werden und eine Maus über 15 Monate (Abb. 2.9 a auf Seite 40). Die zweite Altersgruppe wurde ab einem Alter von 18 Monaten untersucht, einem fortgeschrittenen Stadium der amyloiden Pathologie.

Die Plaquedichte steigt mit zunehmendem Alter an

Die Plaquedichte stieg mit zunehmendem Alter an, was durch die ansteigenden Mittelwerte für zwölf, 14 und 18 Monate bestätigt wurde (Abb. 2.10 a auf Seite 42). Eine Betrachtung der einzelnen Werte für mikroskopierte Positionen zeigte eine sehr hohe Varianz der Plaquedichte zwischen verschiedenen Tieren (Abb. 2.10 d). Zudem war ein sehr großer Anstieg neuer Plaques in der jungen Gruppe zu verzeichnen, in der 50 neue Plaques entstanden bei 101 präexistenten Plaques zu Beginn des Versuches. Dieses Ergebnis korrespondiert mit Studien, in denen ebenfalls ein starker Anstieg der Plaquedichte *ex vivo* im Vergleich von zwölf und 18 bzw. 22 Monate alten Tg2576 Mäusen gemessen wurde (Braakman u. a., 2006; Christie u. a., 2001). In den Tieren der alten Gruppe stagnierte die Bildung neuer Plaques, mit lediglich drei neu entstandenen gegenüber 786 präexistenten Plaques. Daraus folgte, dass die Plaquentstehung ein Plateau erreichte. Diese Schlußfolgerung wurde durch die Daten aus den Langzeitversuchen unterstützt, bei denen nach anfänglichem starken Anstieg der Plaquedichte ebenfalls ein Plateau erreicht wurde (Abb. 2.10 d und Abb. 2.14 d). Ein korrespondierendes Ergebnis wurde in dem APPS1 Mausmodell gemessen, das eine wesentlich ausgeprägtere amyloide Pathologie aufwies (Hefendehl u. a., 2011). In dieser Studie wurde ein Abfall der Plaquentstehungsrate mit zunehmendem Alter gemessen bis keine neuen Plaques mehr gebildet wurden, was dem

Erreichen eines Plateaus der Plaquedichte entsprach. Diese Beobachtungen können mit Hilfe der biophysikalischen Grundlagen zum Plaquewachstum aus zahlreichen *in vitro* Studien erklärt werden (siehe Abschnitt 1.2.3 auf Seite 11). Für die Bildung eines neuen Aggregationskeimes, der zur Entstehung eines amyloiden Plaques führte, war eine kritische Mindestkonzentration des A β -Peptids notwendig. Unter der Annahme einer konstanten Produktion des A β -Peptids wurde die kritische Konzentration anfänglich überschritten und es entstanden viele Aggregationskeime. Daraus bildeten sich Plaques, an deren Oberfläche sich weitere A β -Peptide anlagerten, wodurch diese weiter wuchsen. Je größer die Gesamtoberfläche aller Plaques und die Plaquedichte wurden, desto mehr A β -Peptide konnten sich anlagern und desto geringer wurde die Diffusionszeit bis zur Anlagerung an einen Plaque. Dieser Prozess stand dadurch in direkter Konkurrenz mit der Bildung neuer Aggregationskeime, da die effektiv zur Verfügung stehende lokale A β -Konzentration absank. In diesem Szenario würde die Wahrscheinlichkeit zur Entstehung neuer Plaques weiter sinken bis ein Plateau der Plaquedichte erreicht wäre.

Die anfängliche Plaquedichte im frühen Stadium der amyloiden Pathologie konnte als Prädiktor für die Produktion und Konzentration des A β -Peptids verwendet werden. Je höher die Plaquedichte war, desto mehr A β -Peptid wurde vorher produziert und desto höher sollte die A β -Konzentration sein. Korrespondierende Resultate ergaben die Messungen der A β -Konzentration in der Interstitial- und Zerebrospinalflüssigkeit im direkten Vergleich mit der Plaque-Beladung im Gehirn (Cirrito u. a., 2003; DeMattos u. a., 2002a,b). Da die Plaque-Beladung im Gehirn sehr gut mit der Plaquedichte korrelierte (Abb. 2.14 d auf Seite 47), wurde ein Zusammenhang zwischen Plaquedichte und A β -Produktion nachgewiesen. Demzufolge wäre eine positive Korrelation zwischen der Anzahl neu entstandener Plaques und der A β -Konzentration zu erwarten. Tatsächlich wurde eine starke Korrelation zwischen der Anzahl neu entstandener Plaques pro Volumen- und Zeiteinheit (Plaquentstehungsrate) und der anfänglichen Plaquedichte in der jungen Altersgruppe gemessen. Damit wurde dieser Zusammenhang zum ersten Mal in einem Mausmodell *in vivo* nachgewiesen. In einer klinischen Studie zur Akkumulation von β -Amyloid wurde eine ähnliche Korrelation ermittelt (Villain u. a., 2012). Mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), einem nichtinvasiven bildgebenden Verfahren, konnte die Akkumulation von β -Amyloid im Gehirn lebender Patienten gemessen werden (Mori u. a., 2012; Nordberg, 2004). Dazu wurde eine ^{11}C -markierte Sonde (Pittsburgh compound B, PiB) systemisch appliziert, die an

β -Amyloid bindet, ähnlich dem Fluoreszenzfarbstoff Methoxy-X04 (Mathis u. a., 2003). Diese Sonde reicherte sich innerhalb von Minuten im Gehirn an und die Signalstärke korrelierte mit dem Gehalt an β -Amyloid (Bacskai u. a., 2007, 2003; Klunk u. a., 2004). Die Patienten mit höheren PiB-Signalen in der Eingangsunter-suchung zeigten einen größeren Anstieg des Signals in der Nachuntersuchung 18 Monate später (Villain u. a., 2012).

Für eine repräsentative Messung der Plaquedichte war es nötig, sehr große Volumina innerhalb des kranialen Fensters zu mikroskopieren. Die Plaques waren nicht gleichmäßig über das Gehirn verteilt, was gerade bei niedrigen Plaquedichten einen großen Einfluss auf die Genauigkeit der Messung hatte (Bero u. a., 2012, 2011). Aus diesem Grund wurden mindestens drei Positionen mit Kantenlängen von $850\ \mu\text{m}$ und einer Tiefe von mindestens $300\ \mu\text{m}$ mikroskopiert. Bei einem nutzbaren Durchmesser des kranialen Fensters von $4\ \text{mm}$ entsprach das ungefähr $20\ \%$ der Nutzfläche. Insgesamt wurden in der jungen und alten Gruppe jeweils $3\ \text{mm}^3$ Gehirnvolumen über einen Zeitraum von zwei Monaten beobachtet.

Die mittlere Plaquegröße steigt mit zunehmenden Alter an

Die individuelle und mittlere Plaquegröße sind häufig verwendete Maße zur Analyse der amyloiden Pathologie in histopathologischen Studien. In den meisten Studien wurden die Plaqueflächen als Größenmaß angegeben. Für einen Vergleich zu den Daten dieser Arbeit wurde der Plaqueradius berechnet, da eine lineare Größe besser vorstellbar ist. Unter der Annahme eines stetigen Wachstums amyloider Plaques über lange Zeiträume wäre auch eine Zunahme der mittleren Plaquegröße aufgrund einer Verschiebung des Schwerpunktes in der Größenverteilung zu erwarten. Die Analyse ergab einen Anstieg der mittleren Plaquegröße mit zunehmenden Alter, was die Hypothese bestätigte (Abb. 2.10 b auf Seite 42). Neu entstandene Plaques wiesen den mit Abstand kleinsten mittleren Radius mit $2,3\ \mu\text{m}$ auf. Sie bildeten eine eigenständige Untergruppe aufgrund des kleinen Radius und der Normalverteilung ihrer Größe. Die präexistenten Plaques dagegen waren mehr als zweimal so groß und die Daten folgten einer logarithmischen Normalverteilung. Im Alter von 18 Monaten lag der Durchschnitt bereits bei $10,8\ \mu\text{m}$ und mit 27 Monaten bei $16,7\ \mu\text{m}$ in der Maus aus dem Langzeitversuch. Von zwei unabhängigen Laboren wurden übereinstimmende Ergebnisse berichtet. P. Yan u. a. (2009) publizierten einen mittleren Radius für neu entstandene und präexistente Plaques von $5,4$ und $9,8\ \mu\text{m}$, der in älteren Tieren weiter auf $14,5\ \mu\text{m}$ anstieg. In einer weiteren Studie reichte

die Größenverteilung bis zu $8\ \mu\text{m}$ für neu entstandene Plaques, wobei 87% dieser Plaques einen Radius von unter $4\ \mu\text{m}$ aufwiesen (Hefendehl u. a., 2011). In älteren Tieren war die Größenverteilung bis zu einem Radius von $22\ \mu\text{m}$ erweitert. Zwei Studien aus einem weiteren Labor konnten keine Größenzunahme mit zunehmendem Alter feststellen. In der einen Studie wurde für neu entstandene und präexistente Plaques in jungen Mäusen jeweils ein mittlerer Radius von $5,4\ \mu\text{m}$ gemessen (Meyer-Luehmann u. a., 2008), während die Analyse der anderen Studie für präexistente Plaques in der frühen und späten Phase der amyloiden Pathologie jeweils 9 und $11\ \mu\text{m}$ ergab (Christie u. a., 2001). Diese unterschiedlichen mittleren Plauegrößen zwischen beiden Studien sind nicht konsistent mit der von den Autoren postulierten Hypothese, dass Plaques innerhalb eines Tages wachsen und anschließend die Größe nicht ändern (Arbel-Ornath u. a., 2011). Wenn Plaques in dieser Weise wachsen würden, dürfte kein Unterschied zwischen den mittleren Plauegrößen bestehen. Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit 414 neu entstandene Plaques untersucht (die Therapiestudie mit einbezogen), von denen nicht ein einziger den Radius eines mittelgroßen Plaques aufwies. Möglicherweise gab es Unterschiede in der Sensitivität der Detektion neu entstandener Plaques in der Studie von Meyer-Luehmann u. a. (2008). Ein weiterer Grund für die Diskrepanz könnte die wesentlich niedrigere Anzahl untersuchter neu entstandener Plaques (18) sein.

In postmortalen histologischen Studien von Alzheimer-Patienten wurden ähnliche mittlere Plauegrößen und -verteilungen berichtet wie in den Studien der Mausmodelle (Hibbard u. a., 1994; Hyman u. a., 1993, 1995; Majocha u. a., 1988; Serrano-Pozo u. a., 2012). Die maximalen Plaqueradien konnten durchaus bis zu $100\ \mu\text{m}$ erreichen, abhängig von der Färbemethode und der Auswertung der Bilddaten (Armstrong u. a., 1991; Delaère u. a., 1991).

Die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit amyloider Plaques sinkt mit zunehmendem Alter ab

Für jeden Plaque wurde eine individuelle Wachstumsgeschwindigkeit als lineare Zuwachsrate des Plaqueradius pro Woche berechnet, wodurch eine detaillierte Analyse auf der Ebene einzelner Plaques möglich war. Am schnellsten wuchsen die neu entstandenen Plaques mit einer mittleren Wachstumsrate von $0,47\ \mu\text{m}\ \text{Woche}^{-1}$, gefolgt von den präexistenten Plaques mit $0,33\ \mu\text{m}\ \text{Woche}^{-1}$ im Alter von zwölf bis 14 Monaten (Abb. 2.10 c auf Seite 42). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu wurde sechs Monate später in der alten Gruppe eine

deutliche Reduktion der mittleren Wachstumsrate auf $0,10 \mu\text{m Woche}^{-1}$ gemessen. Diese Abnahme der mittleren Wachstumsrate war auf eine breitere Verteilung bis in den Bereich des negativen Wachstums zurückzuführen, während in jungen Tieren ausschließlich positives Wachstum gemessen wurde. Das Absinken der Wachstumsgeschwindigkeit mit zunehmendem Alter ließ sich durch die Akkumulation amyloider Plaques erklären, wodurch sich die Oberfläche drastisch vergrößerte, an der sich A β -Peptide anlagern konnten. Bei einer annähernd konstanten Produktion von A β -Peptid musste die Wachstumsrate über die Zeit sinken, da sich die gleiche Menge A β -Peptide auf einer immer größer werdenden Oberfläche ablagerte. Interessanterweise gab es eine negative Korrelation zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der Plaquedichte bei der Analyse der jungen und alten Gruppe, die diese Hypothese experimentell bestätigten (Abb. 2.15 b auf Seite 49).

Hefendehl u. a. (2011) konnten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit von neu entstandenen und präexistenten Plaques im APPPS1 Mausmodell feststellen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit aus statistischer Sicht das gleiche Ergebnis gemessen wurde, war die Wachstumsrate für neu entstandene Plaques etwas höher. Ein Grund dafür könnte der kürzere Beobachtungszeitraum von zwei Monaten sein. Demzufolge wurden die mittleren Wachstumsraten der neu entstandenen und präexistenten Plaques aus dem Langzeitversuch über sechs Monate im Tg2576 Mausmodell verglichen (Abb. 2.14 e auf Seite 47). Diese Analyse ergab identische Wachstumsgeschwindigkeiten für beide Gruppen ($0,30$ und $0,28 \mu\text{m Woche}^{-1}$ für neu entstandene und präexistente Plaques), womit der Unterschied auf die unterschiedliche Beobachtungsdauer zurückgeführt werden konnte.

3.2.5 Die verschiedenen Phasen des Wachstums amyloider Plaques

Die Beobachtungen in dem Tg2576 Mausmodell zur Entwicklung von Plaquedichten und der Plaquewachstumsraten in den unterschiedlichen Altersgruppen zeigten offensichtlich zwei Phasen des Plaquewachstums: (1) In der jungen Gruppe (zwölf bis 14 Monate) war die Entwicklung der amyloiden Pathologie in einer dynamischen Phase, die durch einen starken Anstieg der Plaquedichte und ein exponentielles Wachstum der Plaques gekennzeichnet war. (2) In der alten Gruppe (18 bis 21 Monate) wurde eine Sättigungsphase erreicht, in der keine Änderung der Plaquedichte und eine deutliche Verminderung der Plaquewachstumsgeschwindigkeit zu beobachten war. Obwohl dieses Modell einer logischen Argumentation folgte, fehlte

ein direkter Beweis, dass beide Phasen mit dieser zeitlichen Sequenz in einer Maus existierten. Dieser Beweis konnte durch die Messung des Plaquewachstums im Langzeitversuch in zwei Mäusen erbracht werden (Abb. 2.11, 2.12 und 2.14 a auf den Seiten 44–47), wobei eine dieser Mäuse über einen Zeitraum von 15,5 Monaten untersucht wurde. Ein Beobachtungszeitraum von 15,5 Monaten war bislang einzigartig mit dieser Technik. In einer Studie wurden dendritische Spines über einen ähnlichen Zeitraum von 18 Monaten mit der Methode des Ausdünnens des Schädelknochens mikroskopiert (Yang u. a., 2009). Allerdings können mit dieser Methode maximal drei bis fünf Zeitpunkte gemessen werden (Holtmaat u. a., 2009; Yang u. a., 2010), womit eine komplexe Kinetik mit dem Verlauf einer Sigmoid-Funktion nicht ausreichend repräsentiert werden könnte. Zudem sind die Eindringtiefe und die zum Mikroskopieren nutzbare Fläche wesentlich geringer. Somit wäre ein solcher Datensatz mit dieser Technik nicht zu messen.

Die Kinetik des Plaquevolumens zeigte den Verlauf einer Sigmoid-Funktion, sowohl für das mittlere und integrierte Volumen aller Plaques als auch für einzelne Plaques. Eine exponentielle Phase des Wachstums war erwartungsgemäß zu Beginn der Untersuchung zu beobachten. Darauf folgte eine Übergangsphase, die wiederum in eine Sättigungsphase überleitete. Der gleiche Verlauf der Kinetik wurde bereits in *in vitro* Studien zur Aggregation des A β -Peptids über einen wesentlich kürzeren Zeitraum berichtet (Findeis, 2002; Harper u. a., 1997; Jarrett u. a., 1993; Lomakin u. a., 1997; Nicodemi u. a., 2009). Auch die Messungen des Gesamtgehaltes des A β -Peptids im Gehirn des gleichen Alzheimer-Mausmodells zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten den selben Verlauf einer Sigmoid-Funktion wie die Kinetik des Plaquevolumens, was eine zusätzliche Bestätigung des Ergebnisses darstellte (Das u. a., 2012).

Eine Einordnung der Langzeitkinetik in die Datensätze der beiden Altersgruppen deutete auf eine verzögerte Entwicklung der amyloiden Pathologie hin. Diese konnte anhand der Entwicklung der Plaquedichte nachvollzogen werden, die im Alter von zwölf Monaten unter dem Durchschnitt lag und dann stark anstieg. In der Zeitspanne von 18 bis 21 Monaten, entsprechend der älteren Gruppe, wurde im Langzeitversuch ein weiterer Anstieg der Plaquedichte gemessen (Abb. 2.10 d auf Seite 42). Hier befand sich das Wachstum der amyloiden Plaques immer noch in der exponentiellen Phase, während in der alten Gruppe im gleichen Alter deutlich niedrigere Wachstumsraten zu verzeichnen waren. Diese Befunde legten eine differenzierte Analyse der Wachstumsraten im Langzeitversuch nahe, entsprechend der

exponentiellen Phase von zwölf bis 23,5 Monaten und der Sättigungsphase von 23,5 bis 27,5 Monaten, die korrespondierende Werte wie in der jungen und alten Gruppe ergaben (Abb. 2.13 auf Seite 46). Dieses Ergebnis deutete auf eine Verzögerung der Sättigungsphase im Langzeitversuch hin. Eine Bestätigung für eine große Varianz in der Entwicklung der amyloiden Pathologie gaben die beiden anderen Beispiele der Langzeituntersuchung von zwölf bis 18 Monaten. In einer dieser Mäuse wurde bereits zu Beginn der Untersuchung eine sehr hohe Plaquedichte von über 100 mm^{-3} gemessen, die bis zu 200 mm^{-3} anstieg, was eine sehr starke A β -Produktion voraussetzte (Abb. 2.14 d auf Seite 47). Die Kinetik des Plaquevolumens zeigte einen exponentiellen Verlauf bis zum Alter von 18 Monaten (Abb. 2.14 b, d). Im Gegensatz dazu wies die zweite Maus eine sehr geringe Plaquedichte von 9 mm^{-3} auf, die sich nur unwesentlich auf 22 mm^{-3} erhöhte. Die daraus folgende sehr geringe A β -Produktion führte zu einem früheren Erreichen der Sättigungsphase des Plaquewachstums vor einem Alter von 18 Monaten (Abb. 2.14 a, d). Beide Beispiele belegten eine hohe Varianz in der Entwicklung der amyloiden Pathologie. Dieser Befund wurde zusätzlich unterstützt, durch die Messung der Plaquedichten im Alter von zwölf Monaten in einer sehr großen Anzahl von Mäusen (23) aus dem Therapieversuch. Deren Plaquedichten variierten ebenfalls sehr stark im Bereich von 10 bis 100 mm^{-3} (Abb. 2.18 b auf Seite 54). Ein weiterer nicht komplett auszuschließender Einfluss war eine mögliche Interferenz des Farbstoffes zur Detektion amyloider Plaques mit deren Wachstumskinetik. Cohen u. a. (2009) zeigten eine Reduktion der Anzahl amyloider Plaques durch die Behandlung mit Methoxy-X04 in einem Alzheimer-Mausmodell. Diesen Mäusen wurden jedoch neun Dosen mit einer 50-fach höheren Konzentration des Farbstoffes innerhalb von drei Wochen appliziert, sodass beide Studien nur schwer miteinander vergleichbar waren.

Die sehr lange, nahezu ein Jahr andauernde, exponentielle Wachstumsphase im Langzeitversuch bedingte, dass die A β -Produktion und folglich -Konzentration nicht der limitierende Faktor war. Zur Anlagerung an die immer größer werdende Oberfläche an β -Amyloid wurden immer größere Mengen an A β -Peptid benötigt, um eine konstante Wachstumsrate aufrecht zu erhalten. Interessanterweise waren die Plaquewachstumsraten einzelner Plaques sehr breit verteilt (zwischen 0 und $0,8 \mu\text{m Woche}^{-1}$, Abb. 2.10 f auf Seite 42 und Abb. 2.14 e auf Seite 47), was auf einen Einfluss lokaler Faktoren auf die Wachstumsraten vermuten ließ. Ein Vergleich der mittleren Wachstumsraten von dem Tg2576 (aus dieser Studie) und APPPS1 Mausmodell (Hefendehl u. a., 2011) zeigte nahezu identische Werte von ungefähr $0,3 \mu\text{m Woche}^{-1}$

während der frühen, dynamischen Phase, obwohl beide Mausmodelle starke Unterschiede in der A β -Produktion aufweisen. Dies bestätigte die Annahme, dass die A β -Produktion nicht der limitierende Faktor für die Wachstumsrate in der exponentiellen Phase war. Die amyloide Pathologie in APPPS1 Mäusen verläuft sehr aggressiv, beginnt bereits ab sechs Wochen und führt nach acht Monaten zu einer Plaque-Beladung des Gehirns von 10% (Radde u. a., 2006, 2008). Im Gegensatz dazu beginnt die amyloide Pathologie in Tg2576 Mäusen erst mit neun bis zehn Monaten und schreitet wesentlich langsamer voran (Hsiao u. a., 1996). Die Messung der gleichen mittleren Wachstumsrate in beiden Mausmodellen trotz stark unterschiedlicher A β -Produktion ließ auf eine maximale Wachstumsrate *in vivo* schließen. *In vitro* Studien zur Aggregation des A β -Peptids zeigten bereits ein oberes Limit der Wachstumsrate amyloider Fibrillen in Abhängigkeit von der A β -Konzentration (Lomakin u. a., 1996; Morris u. a., 2009). Diese Befunde in Kombination konnten folgendermaßen interpretiert werden: (1) Eine gemeinsame maximale Wachstumsrate beider Mausmodelle (aus globaler Sicht) setzte voraus, dass die A β -Konzentration nicht der limitierende Faktor für das Wachstum der Plaques war. (2) Die breite Verteilung der Wachstumsraten einzelner Plaques bedingte, dass andere lokale Faktoren die Wachstumsraten der Plaques beeinflussten. Neben der Sequenz des aggregierenden Proteins, die in beiden Mausmodellen gleich war, haben deren Ladung und hydrophoben Eigenschaften eine Wirkung auf die Aggregationsgeschwindigkeit (Chiti u. a., 2006, 2003, 2000, 2002; Fernandez-Escamilla u. a., 2004). Beide Eigenschaften werden durch äußere Faktoren bestimmt, wie z.B. pH-Wert und Ionenstärke des Lösungsmittels (DuBay u. a., 2004; Finder u. a., 2007; Nielsen u. a., 2001). In Gehirnschnitten von Alzheimer-Patienten wurde ein pH-Optimum von sieben für die Wachstumsrate von Plaques bei Zugabe von synthetischem A β -Peptid gemessen (Esler u. a., 1996). Zudem können A β -Peptide mit Zellmembranen interagieren, wodurch das Aggregationsverhalten ebenfalls beeinflusst wird (Terzi u. a., 1995, 1997).

Wenn die stark unterschiedliche A β -Produktion im APPPS1 und Tg2576 Mausmodells zu der gleichen mittleren Wachstumsrate der Plaques führte, stellte sich die Frage, in welchem Parameter sich der Unterschied widerspiegelte. Eine stringente Antwort lieferte ein Vergleich der Plaquedichten in beiden Mausmodellen. In der Studie der APPPS1 Maus von Hefendehl u. a. (2011) wurde leider keine Plaquedichte angegeben, aber noch nicht veröffentlichte Daten aus unserem Labor ergaben eine mittlere Plaquedichte von 631 mm^{-3} (sechs Mäuse im Alter von vier Monaten).

In dem Tg2576 Mausmodell wurde eine mehr als zwanzigfach geringere Plaquedichte von 26 mm^{-3} in einem vergleichbaren Stadium zwei Monate nach Beginn der amyloiden Pathologie gemessen (Abb. 2.10 a, d auf Seite 42). Die Plaquedichten stiegen über den Zeitraum von sechs Monaten deutlich an. In dem Tg2576 Mausmodell wurde jedoch mit 191 mm^{-3} nicht das gleiche Niveau erreicht wie in dem APPPS1 Mausmodell. Ein korrespondierender Zusammenhang wurde für die durchschnittliche Dauer bis zur Bildung eines Aggregationskeimes in Abhängigkeit von der A β -Konzentration in mehreren *in vitro* Studien berichtet (Hortschansky u. a., 2005; Pellarin u. a., 2006; Wetzel, 2006). Demzufolge steigt die Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Aggregationskeimes, aus dem ein amyloider Plaque entstehen kann, mit zunehmender A β -Konzentration an. Dieser Effekt war in beiden Mausmodellen zu beobachten. Das Tg2576 Mausmodell mit der niedrigeren A β -Produktion wies eine deutlich niedrigere Plaquedichte auf als das APPPS1 Mausmodell mit der hohen A β -Produktion. Ein Vergleich der Plaquedichten in beiden Mausmodellen stellte somit eine weitere Bestätigung dar, dass die Plaquedichte ein guter Prädiktor für die A β -Produktion war. Diese Schlussfolgerung wurde zusätzlich unterstützt durch den Vergleich der Plaqueentstehungsraten über einen Zeitraum von zwei Monaten. Hefendehl u. a. (2011) berichteten eine Plaqueentstehungsrate von $35 \text{ Woche}^{-1} \text{ mm}^{-3}$ für das APPPS1 Mausmodell, die zehnmal höher war wie in dem Tg2576 Mausmodell ($3,4 \text{ Woche}^{-1} \text{ mm}^{-3}$, Abb. 2.18 d auf Seite 54).

Die sehr lange Beobachtungsdauer von 15,5 Monaten ermöglichte die Untersuchung mehrerer Zusammenhänge, die ausschließlich von einer nahezu kompletten Plaquewachstumskinetik gewonnen werden konnten. Aus statistischer Sicht sind die Beobachtungen aus einem Individuum nicht ausreichend für einen Hypothesentest, aber es wurden eine große Anzahl von Plaques (90) untersucht. Mit Hinblick auf die Einzigartigkeit dieses Datensatzes könnten die Ergebnisse zumindest eine genauere Analyse der Zusammenhänge des Plaquewachstums in dieser einen Maus darstellen, aber keine Allgemeingültigkeit erlangen. Eine Korrelation des Plaqueradius am Ende der Untersuchung mit dem Alter der Plaqueentstehung zeigte, dass sehr große Plaques früh in der Entwicklung der amyloiden Pathologie entstanden (Abb. 2.15 c auf Seite 49). Der Endradius der amyloiden Plaques korrelierte sehr gut mit der jeweiligen Plaquewachstumsrate, was bei einem physiologischen Wachstum zu erwarten wäre. Zwischen dem Abstand benachbarter Plaques und der Differenz der Wachstumsraten konnte kein Zusammenhang ermittelt werden. Aus dieser Beobachtung folgte, dass die Plaquewachstumsraten einzelner Plaques durch lokale

Faktoren bestimmt wurden.

3.2.6 Zusammenfassung

Amyloide Plaques wuchsen sehr langsam und stetig über mehrere Monate bis über ein Jahr in Alzheimer-Mausmodellen. Das Ergebnis von P. Yan u. a. (2009) konnte für präexistente Plaques bestätigt werden. Zusätzlich wurden korrespondierende Resultate für das Wachstum neu entstandener Plaques ermittelt, wie praktisch gleichzeitig von Hefendehl u. a. (2011) und Burgold u. a. (2011) publiziert wurde. Die bereits publizierten Studien aus vier unabhängigen Laboren, aus denen ein physiologisches Wachstum amyloider Plaques folgte, zeigten ein charakteristisches Bild des Plaquewachstums (Bittner u. a., 2012; Burgold u. a., 2011; Condello u. a., 2011; Hefendehl u. a., 2011; P. Yan u. a., 2009). Neu entstandene Plaques wiesen mit Abstand die kleinste Größe auf, die deutlich geringer war im Vergleich zu präexistenten Plaques. Sowohl neu entstandene als auch präexistente Plaques wuchsen stetig über sehr lange Zeiträume. In dieser Entwicklung entstanden neue Plaques, wodurch die Plaquedichte anstieg. Während der späten Phase der amyloiden Pathologie sank das Wachstum der Plaques stark ab und es wurden keine weiteren neuen Plaques gebildet (Bittner u. a., 2012; Burgold u. a., 2011; Christie u. a., 2001).

In dieser Studie wurde das Plaquewachstum sehr detailliert in zwei verschiedenen Altersgruppen in einer frühen und späten Phase der amyloiden Pathologie analysiert. Zusätzliche Informationen zur Plaquewachstumskinetik wurden aus einem Langzeitversuch gewonnen, der die Zeitspanne beider Altersgruppen überspannte. Die quantitative Auswertung von Plaqueradien, -wachstumsraten und -dichten führte zum *in vivo* Nachweis mehrerer Zusammenhänge: (1) Die Plaquentstehungsrate in der frühen Phase der amyloiden Pathologie korrelierte mit der Plaquedichte zu Beginn der Untersuchung. Aus diesem Ergebnis ließ sich ableiten, dass Mäuse mit einer höheren Plaquedichte mehr A β -Peptid produzierten, wodurch mehr Plaques entstehen konnten. (2) Die Plaquewachstumsrate sank mit zunehmendem Alter. Diese Beobachtung spiegelte sich auch durch eine negative Korrelation der Plaquewachstumsrate mit der Plaquedichte über beide Altersgruppen wider. (3) Plaques mit einem sehr großen Endradius wurden sehr früh in der Entstehungsphase gebildet. (4) Die Größe eines Plaques am Ende der Untersuchung korrelierte mit dessen Wachstumsrate. (5) In der frühen Phase der Plaquentwicklung wuchsen die amyloiden Plaques mit einer maximalen mittleren Wachstumsrate. Daraus folgte, dass die Wachstumsrate nicht durch die A β -Konzentration limitiert war. (6) Die Wachstums-

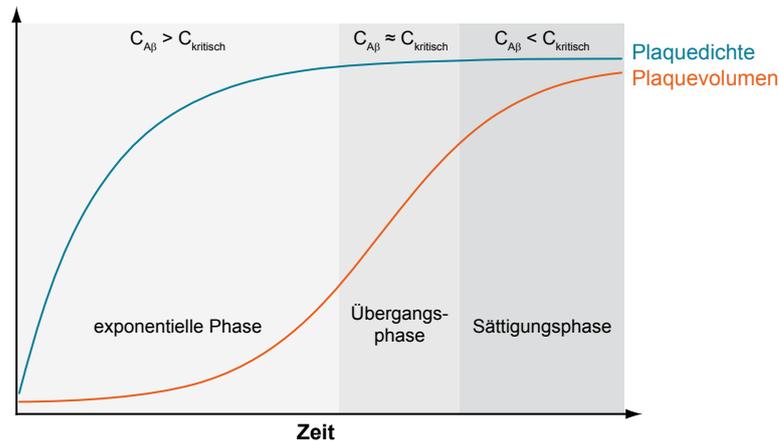


Abb. 3.1: Zusammenfassung der verschiedenen Phasen des Plaquewachstums. Die Kinetik des Plaquevolumens folgte einer Sigmoid-Funktion und die Plaquedichte zeigte die Form einer einphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion. Anhand der Kinetik des Plaquevolumens konnten drei Phasen des Plaquewachstums eingeteilt werden: (1) eine exponentielle Phase (2) eine Übergangsphase und (3) eine Sättigungsphase. Diesen einzelnen Phasen konnten Bedingungen für die A β -Konzentrationen aus der Kinetik der Plaquedichte zugeordnet werden, da für die Bildung eines Aggregationskeimes, der zur Entstehung eines Plaques führte, eine Mindestkonzentration des A β -Peptids notwendig war. In der exponentiellen Phase entstanden sehr viele neue Plaques, weshalb die A β -Konzentration wesentlich höher als die Mindestkonzentration sein musste. Während der Übergangsphase änderte sich die Plaquedichte nur sehr wenig, d. h. die A β -Konzentration lag in der Nähe der Mindestkonzentration. In der Sättigungsphase wurden keine weiteren Plaques gebildet, woraus folgte, dass die A β -Konzentration niedriger als die Mindestkonzentration war.

raten individueller Plaques waren sehr breit verteilt, was unter Berücksichtigung von Punkt (5) auf einen Einfluss lokaler Faktoren auf die Wachstumsraten schließen ließ. Diese Schlussfolgerung wurde zusätzlich gestärkt, da kein Zusammenhang zwischen Wachstumsraten benachbarter Plaques detektiert wurde.

In einem Langzeitversuch über 15,5 Monate konnte erstmals eine komplette Kinetik der Entstehung und des Wachstums amyloider Plaques beobachtet werden. Die Kinetik des Plaquevolumens folgte einer Sigmoid-Funktion, während die Plaquedichte an eine einphasige exponentielle Assoziationsfunktion angepasst werden konnte. Anhand der Kinetik des Plaquevolumens konnten drei Phasen des Plaquewachstums eingeteilt werden: (1) eine exponentielle Phase (2) eine Übergangsphase und (3) eine Sättigungsphase (Abb. 3.1 auf dieser Seite). Korrespondierend wurden aus der Kinetik der Plaquedichte entsprechende Bedingungen für die A β -Konzentrationen den einzelnen Phasen zugeordnet. Dazu wurden Erkenntnisse aus *in vitro* Studien angewandt, dass für die Bildung eines Aggregationskeimes zur Entstehung eines Plaques, eine Mindestkonzentration des A β -Peptids notwendig war (Harper

u. a., 1997; Jarrett u. a., 1993). In der exponentiellen Phase entstanden sehr viele neue Plaques, weshalb die A β -Konzentration wesentlich höher als die Mindestkonzentration sein musste. In dieser Phase dominierte die Plaquentstehung und die A β -Konzentration war nicht limitierend für das Plaquewachstum. Während der Übergangsphase änderte sich die Plaquedichte wenig, d. h. die A β -Konzentration lag in der Nähe der Mindestkonzentration. In der Sättigungsphase wurden keine weiteren Plaques gebildet, woraus folgte, dass die A β -Konzentration niedriger als die Mindestkonzentration war (Abb. 3.1). Zusätzlich war diese Phase durch ein vermindertes Plaquewachstum gekennzeichnet, aufgrund der immer größer werdenden Oberfläche an dem sich die produzierte Menge an A β -Peptid anlagerte. Mit dem in der Klinik häufig verwendeten bildgebenden Verfahren PET in Kombination mit der an β -Amyloid bindenden Sonde PiB konnte in Patienten mit der familiären Form der Alzheimerschen Erkrankung eine ähnliche, Sigmoid-förmige Kinetik gemessen werden (Bateman u. a., 2012; Jack u. a., 2013), wie sie bereits zuvor postuliert wurde (Jack u. a., 2010). Interessanterweise begann die Akkumulation von β -Amyloid bereits 20 Jahre vor dem Start klinischer Symptome. Die Kinetik konnte in dieselben drei Abschnitte mit einer exponentiellen Phase, Übergangs- und Sättigungsphase eingeteilt werden wie in dem Alzheimer-Mausmodell. Das Plateau der Beladung mit β -Amyloid wurde nach dem Beginn der klinischen Symptome erreicht. Durch diese Studie konnten inkonsistente Ergebnisse anderer PET-Studien eingeordnet werden. So wurde in einigen Studien von einem starken Anstieg der Beladung mit β -Amyloid berichtet (Grimmer u. a., 2010; Jack u. a., 2009; Kadir u. a., 2012; Koivunen u. a., 2011; Rinne u. a., 2010; Sojkova u. a., 2011; Villemagne u. a., 2011), während in anderen Studien nur von kleinen oder keinen Änderungen berichtet wurde (Engler u. a., 2006; Jagust u. a., 2010; Kadir u. a., 2008, 2011; Scheinin u. a., 2009).

Die beschriebenen Ergebnisse zur quantitativen Auswertung von Plaqueradien, -wachstumsraten und -dichten und die daraus entstandenen Schlussfolgerungen zeigten korrespondierende Zusammenhänge zu *in vitro* Studien der Aggregation des A β -Peptids. Diese Translation der in der Literatur beschriebenen *in vitro* Modelle auf die *in vivo* Wachstumskinetik in einem Alzheimer-Mausmodell bildet die Grundlage für verlässliche präklinische Therapiestudien zur Verminderung der amyloiden Pathologie. Die komplette Wachstumskinetik im Alzheimer-Mausmodell über nahezu anderthalb Jahre verlief wesentlich schneller als in Alzheimer-Patienten mit 15 bis 20 Jahren Dauer der Akkumulation von β -Amyloid (Bateman u. a., 2012; Jack u. a., 2013). Trotz dieser Unterschiede in der Entwicklungsdauer können wich-

tige Rückschlüsse aus präklinischen Studien in Alzheimer-Mausmodellen aufgrund des gleichen Sigmoid-förmigen Verlaufs der Kinetik auf die Situation in Alzheimer-Patienten übertragen werden.

3.3 Der Einfluss einer passiven Immunisierung gegen A β -Oligomere auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques und die Synapsendichten

Die Immuntherapie ist eine vielversprechende Strategie um den Verlauf neurodegenerativen Erkrankungen positiv zu beeinflussen (Brody u. a., 2008). In dieser Studie wurden die Effekte eines Antikörpers gegen A β -Oligomere auf das Wachstum amyloider Plaques und die Synapsendichte in verschiedenen Regionen des Tg2576 Alzheimer-Mausmodell untersucht. Der verwendete Antikörper gegen A β -Oligomere (A-887755) war hochspezifisch und bindet weder monomere A β -Peptide noch fibrilläre A β -Aggregate (Hillen u. a., 2010). Aufgrund dieser Eigenschaft werden mit einer Immuntherapie gegen A β -Oligomere nur deren toxische Effekte neutralisiert, während eine Immuntherapie gegen das A β -Peptid möglicherweise mit dessen physiologischer Funktion interferiert (Lemere u. a., 2010). Da A β -Oligomere nur einen kleinen Teil an der Gesamtmenge des A β -Peptids darstellen, wurde der Antikörper gegen A β -Oligomere mit einem an jede Form von A β bindenden Antikörper (6G1) und einem unspezifischen, nicht an A β bindenden Antikörper verglichen.

3.3.1 Einfluss auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques

Ausgehend von der detaillierten Analyse der Plaqueswachstumskinetik wurde der Effekt einer Immuntherapie in der dynamischen und frühen Phase von zwölf bis 14 Monaten *in vivo* in dem Tg2576 Alzheimer-Mausmodell untersucht. Die Ausgangsbedingungen waren hinsichtlich der mittleren Plaquesgröße und Plaquesdichte für alle Behandlungsgruppen gleich (Abb. 2.18 a, b auf Seite 54). Auffällig war die breite Verteilung der Plaquesdichte zwischen einzelnen Mäusen von 10 bis 100 mm⁻³, die auf eine stark unterschiedliche Produktion des A β -Peptids schließen ließ. Die Plaquesdichte nahm in jeder Behandlungsgruppe über den Beobachtungszeitraum von acht Wochen zu, aber die korrespondierenden Plaquesentstehungsraten unterschieden sich nicht. Daraus folgte, dass diese Antikörper die Bildung neuer Plaques nicht beeinflussten. Ein Vergleich der Plaqueswachstumsraten neu entstandener und

präexistenter Plaques zeigte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 2.18 e, f). Zumindest für den 6G1 Antikörper, der alle Formen des A β -Peptids bindet, wäre ein Effekt auf die Plaquewachstums- und/oder Plaquentstehungsrate zu erwarten.

In zahlreichen Studien mit verschiedenen Alzheimer-Mausmodellen wurde eine Reduktion der Beladung des Gehirns mit amyloiden Plaques berichtet. Die Art der Immunisierung war nicht ausschlaggebend für das Resultat in der vorliegenden Arbeit, da sowohl für aktive Immunisierungen (Bard u. a., 2003; Das u. a., 2003, 2001; Janus u. a., 2000; Schenk u. a., 1999; Weiner u. a., 2000) als auch für passive Immunisierungen reduzierte Beladungen des Gehirns mit amyloiden Plaques beobachtet wurden (Bard u. a., 2003, 2000; DeMattos u. a., 2001; Hartman u. a., 2005; Pfeifer u. a., 2002; Tamura u. a., 2005). In diesen Studien wurde zur Messung der Beladung des Gehirns mit amyloiden Plaques eine Antikörperfärbung verwendet, mit der jede Form des A β -Peptids detektiert werden konnte. Dagegen wurde die hier *in vivo* gemessene Wachstumsrate nur von fibrillären Plaques bestimmt, da sich der verwendete Fluoreszenzfarbstoff ausschließlich an Fibrillen mit einer β -Faltblattstruktur anlagerte. Auch dieser Unterschied schien nicht entscheidend zu sein, da in einigen publizierten Studien auch eine Reduktion fibrillärer Plaques detektiert wurde (Maier u. a., 2006; Morgan u. a., 2000; Wilcock u. a., 2004a,b). Eine mögliche Ursache für den fehlenden Effekt des 6G1 Antikörpers könnte die kurze Dauer der Behandlung von zwei Monaten und der Startzeitpunkt zu Beginn der dynamischen Phase der Plaquentwicklung sein. In den meisten angeführten Studien wurde über einen langen Zeitraum von mehreren Monaten und oftmals sehr zeitig, teilweise noch vor der Entwicklung amyloider Plaques therapiert. Letzterer Aspekt wurde in einer weiteren Studie untersucht. Eine Reduktion der Beladung des Gehirns mit β -Amyloid wurde lediglich bei Behandlung vor Beginn der amyloiden Pathologie detektiert (Levites u. a., 2006a). Dagegen war der Therapieerfolg wesentlich geringer, wenn die Behandlung nach Entstehen der ersten Plaques begonnen wurde. Weiterhin könnte die reduzierte Bildung von fibrillärem A β -Peptid erst zeitverzögert nach Absinken der löslichen A β -Spiegel einsetzen. A. Wang u. a. (2011) berichteten ebenfalls keine Reduktion fibrillärer Plaques nach drei Monaten Behandlung mit dem Antikörper AB9, der eine ähnliche Charakteristik wie der 6G1 Antikörper aufweist (Levites u. a., 2006b). Dagegen wurde ein deutliches Absinken des Gehalts löslicher Formen des A β -Peptids gemessen (A. Wang u. a., 2011).

Die Immuntherapie hatte weder einen Einfluss auf die Plaquentstehungsrate

noch auf die Plaquewachstumsrate. Für den Antikörper gegen A β -Oligomere war nicht notwendigerweise ein Effekt zu erwarten, da diese Form des A β -Peptids nur einen kleinen Anteil der Gesamtmenge darstellt. Eine starke Veränderung der A β -Konzentration durch Veränderung des Äquilibrium zwischen löslichen A β -Monomeren und A β -Oligomeren aufgrund deren Neutralisation ist sehr unwahrscheinlich. Zudem wurde für A β -Oligomere ein anderer Weg der Aggregation vorgeschlagen, der auf einer Konformationsänderung des A β -Peptids basiert (Barghorn u. a., 2005; Gellermann u. a., 2008). Dagegen wurde die Neutralisation der toxischen Wirkung von A β -Oligomeren mit diesem Antikörper bereits bewiesen (Hillen u. a., 2010; Perez-Cruz u. a., 2011). Der unspezifische Antikörper gegen alle Formen des A β -Peptids zeigte nicht einmal eine Tendenz zur Reduktion der Plaquewachstumsrate. Offensichtlich wurde die Konzentration des A β -Peptids nicht so stark verringert, dass eine Änderung des Plaquewachstums folgte. Aus *in vitro* Studien ist bekannt, dass das Gleichgewicht bei der Aggregation des A β -Peptids stark in Richtung Fibrillen verschoben ist, was eine starke Änderung der A β -Konzentration für eine Verschiebung des Gleichgewichts bedingt (Harper u. a., 1997; Jarrett u. a., 1993). Dieser Befund korrespondiert zusätzlich mit der Schlussfolgerung aus dem Abschnitt zur Untersuchung der Wachstumskinetik amyloider Plaques, dass die A β -Konzentration nicht der limitierende Faktor in diesem Beobachtungszeitraum ist (Abschnitt 3.2.4 auf Seite 82). Aus den Ergebnissen folgt, dass eine derartige Therapie möglichst früh in der Entwicklung der Pathologie beginnen und möglicherweise mit anderen therapeutischen Strategien kombiniert werden sollte (Citron, 2010; Gauthier u. a., 2012; Selkoe, 2012). Die ersten Präventionsstudien zur Reduktion der Beladung des Gehirns mit β -Amyloid in asymptomatischen Probanden werden bereits organisiert und wurden teilweise schon gestartet – die Ergebnisse werden für die Therapie von Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Erkrankungen richtungweisend sein (Callaway, 2012; Garber, 2012; Mullard, 2012; Selkoe, 2012).

3.3.2 Etablierung der Synapsenfärbung und -auswertung

Für die Untersuchung des Effektes der Immunisierung auf Synapsen in Kombination mit amyloiden Plaques wurde eine Färbung von drei Komponenten etabliert – glutamatergen Postsynapsen (PSD-95), Präsynapsen (Synapsin) und amyloiden Plaques (Methoxy-X04). Zu der blauen Fluoreszenz von Methoxy-X04 wurden ein grüner (Alexa488) und roter Farbstoff (Alexa647) für die Sekundärantikörper zur Detektion der Synapsensubtypen ausgewählt, sodass eine perfekte Trennung der

Fluoreszenz aller drei Komponenten gegeben war. Die Färbungen der Synapsen zeigten wenig Überlappung des Fluoreszenzsignals, ein Indiz für die Markierung verschiedener Synapsensubtypen. Ein weiteres Indiz für die Färbung des spezifischen Kompartiments war die Assoziation der Postsynapsen (PSD-95) mit dem dendritischen Marker MAP-2 (Abb. 2.19 auf Seite 56). Die Fluoreszenzaufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop in Kombination mit einem höchstkorrigierten Objektiv waren ausreichend, um einzelne Synapsen aufzulösen. Der mittlere Abstand benachbarter Synapsen in Schicht III des zerebralen Cortex von Ratten wurde von Merchán-Pérez u. a. (2013) bestimmt und betrug 500 nm. Die Kombination einer spezifischen Antikörperfärbung mit moderner Laser-Scanning-Mikroskopie bot somit eine optimale Technik zur Unterscheidung einzelner Synapsen. Zudem waren die Gehirnschnitte mit einer Dicke von 50 μm komplett in jeder Tiefe des Gewebes gefärbt. Eine zusätzliche Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurde durch die dreidimensionale Dekonvolution der Bilder erreicht. Zur Verbesserung der Auflösung in z-Richtung wurden in einigen Studien Ultradünnschnitte von 50 bis 200 nm Dicke verwendet (Koffie u. a., 2009; Micheva u. a., 2007). Diese Technik ist sehr aufwendig und die Anzahl prozessierter Gehirnschnitte (150) und die Untersuchung vier verschiedener Gehirnregionen wäre mit dieser Methode nicht in absehbarer Zeit zu bewältigen.

Die automatische Auswertung mittels Software (IGOR Pro) funktionierte sehr gut, um die punktförmigen Synapsen zu detektieren. Die starken Unterschiede in der Helligkeit einzelner Synapsen wurden durch die Anwendung eines Laplace-Operators innerhalb der Bildebene kompensiert im Vergleich zu einer einfachen Schwellenwertsegmentierung (Abschnitt 4.4.4 auf Seite 124). Diese Art der Detektion von Synapsen ermöglichte die quantitative Bestimmung der Synapsenzahl in einer Fläche. Oftmals wurde die Intensität der Fluoreszenz als korrespondierendes Maß zur Anzahl der Synapsen verwendet, obwohl die Intensität vielmehr den Gehalt des Markerproteins als die reale Anzahl von Synapsen widerspiegelt. Zudem ist eine reine Intensitätsmessung sehr anfällig für eine Vielzahl von Fehlerquellen, z.B. unterschiedliche Qualität der Färbung verschiedener Gehirnschnitte, Messung in unterschiedlicher Tiefe des Gewebes und fehlende Kontrolle über die absolute Anregungsintensität. Für eine absolute Quantifizierung der Synapsenzahl ohne Bias wäre die Anwendung einer stereologischen Methode notwendig (Fiala u. a., 2001; Schmitz u. a., 2005, 2007; West, 2012). Zur stereologischen Untersuchung wird ein Mikroskop mit spezieller Ausstattung benötigt, das zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar war

(Lemmens u. a., 2010). Die wichtigste Bedingung der stereologischen Methode ist die Untersuchung vieler systematisch randomisierter Regionen, sodass die Wahrscheinlichkeit detektiert zu werden, für jedes Objekt gleich ist. Es wurde versucht diese Forderung zu erfüllen, indem sehr große Flächen (75x75 μm) und viele Positionen (fünf Gehirnschnitte \times drei Positionen) mikroskopiert wurden. Für eine akkurate Bestimmung der absoluten Anzahl von Synapsen in einem Volumen müssten die Synapsen nach der Methode des optischen Dissektors gezählt werden (Gundersen u. a., 1988; West, 1999; Williams u. a., 1988). Diese Methodik könnte in die automatische Auswertungsroutine für zukünftige Studien implementiert werden.

3.3.3 Reduktion der Dichte von Postsynapsen durch die Überproduktion des Amyloid-Vorläuferproteins

Die Dichten der glutamatergen Postsynapsen (PSD-95) waren in der Schicht I/II des visuellen Cortex und dem Stratum radiatum der CA1 Region des Hippocampus aufgrund der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins reduziert (Abb. 2.21 a auf Seite 59). Im Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus dentatus und im Stratum oriens der CA1 Region des Hippocampus wurde der gleiche Trend detektiert, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Diese Ergebnisse korrespondierten mit Westernblot-Analysen von Zellkultur- und Gehirnhomogenaten des Proteingehaltes von PSD-95 in Tg2576 Mäusen (Almeida u. a., 2005; Calon u. a., 2004). In einer Elektronenmikroskopiestudie wurde keine Reduktion der Dichte von Postsynapsen mittels Immunfärbung gegen Drebrin A als Markerprotein in einem APP/PS1 Mausmodell gemessen (Mahadomrongkul u. a., 2005). Die unterschiedlichen Resultate könnten durch die niedrige Individuenzahl (zwei bis vier Mäuse) und/oder die selektive Zählung nicht aller Drebrin A-positiven Postsynapsen in der Studie von Mahadomrongkul u. a. (2005) bedingt sein.

Für die quantitative Analyse von Postsynapsen wurde sich in den meisten Studien auf dendritische Spines fokussiert, die durch Färbung des gesamten Dendritenbaumes von Neuronen markiert wurden. Im Abschnitt 2.1 auf den Seiten 28–33 wurden mit dieser Methodik keine Unterschiede in der Spinedichte apikaler Dendriten von Schicht II/III Neuronen und eine erhöhte Spinedichte für Schicht V Neurone unter der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins gemessen. Die Ergebnisse beider Methoden waren nicht direkt vergleichbar. Die Messung der Spinedichte am Dendritenbaum war eine spezifische Einzelzellanalyse, die sowohl von der Dendritenlänge als auch der Anzahl dendritischer Spines des Neurons abhängig war. Bei

der Färbung aller PSD-95 positiven Synapsen war die Analyse unabhängig von der Neuronenstruktur und spiegelte die Gesamtzahl einer bestimmten Synapsenart in einer Region wider. Mit dieser Methode konnten sehr gut generelle Effekte untersucht werden.

Die passive Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern gegen das A β -Peptid (6G1) und gegen A β -Oligomere (A-887755) führte zu einer Erhöhung der Dichte von Postsynapsen im visuellen Cortex, die mit einer Erhöhung der Varianz einherging (Abb. 2.21 b auf Seite 59). Aufgrund der Kompensation des statistischen Mehrfachvergleiches war der signifikante Unterschied zwischen Wildtypmäusen und transgenen Mäusen nicht mehr vorhanden. Im Stratum radiatum der CA1 Region des Hippocampus war kein Trend für einen therapeutischen Effekt zu erkennen. Aus beiden Befunden in Kombination folgte: Für eine robuste statistische Auswertung muss in zukünftigen Studien die Individuenzahl erhöht werden. Vor allem die niedrige Anzahl an Wildtyptieren (vier) war nicht ausreichend und sollte mindestens auf sechs, besser acht Individuen erhöht werden. Aufgrund der regionalen Inkonsistenz des Therapieeffektes sollte dieser in einer weiteren Studie überprüft werden. Weiterhin könnte die Genauigkeit des hier etablierten Protokolls durch die rigorose Anwendung stereologischer Methoden verbessert werden.

Die Dichte des präsynaptischen Markers Synapsin war in keiner der vier untersuchten Regionen durch die Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins verändert (Abb. 2.21 d auf Seite 59). In mehreren stereologischen Studien mit dem präsynaptischen Marker Synaptophysin (Immunfluoreszenzfärbung) wurden korrespondierende Ergebnisse im Stratum radiatum der CA1 region, dem Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus Dentatus und der Schicht II/III des entorhinalen Cortex berichtet (Dong u. a., 2007, 2009, 2008). Es wurde das gleiche Mausmodell verwendet und im Alter von sechs bis neun und 15 bis 18 Monaten untersucht. Eine quantitative Analyse mittels elektronenmikroskopischer Ultrastrukturanalyse zeigte reduzierte Synapsendichten im Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus Dentatus in beiden Altersgruppen und in der Schicht II/III des entorhinalen Cortex in der alten Gruppe (Dong u. a., 2007). Eine logische Erklärung für die Diskrepanz zwischen beiden Methoden wurde nicht diskutiert. Eine weitere Studie in einem anderen Alzheimer-Mausmodell (APP23) stützte den Befund, dass die Dichte des präsynaptischen Markers Synaptophysin nicht reduziert war (Boncristiano u. a., 2005). Hier wurde der Neocortex mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen Synaptophysin unter Anwendung stereologischer Methoden untersucht. Es wurden auch gegensätzliche Er-

gebnisse berichtet. In 18 Monate alten PDAPP Mäusen waren die Synaptophysin-positiven Synapsen im frontalen Neocortex und dem Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus Dentatus reduziert (Buttini u. a., 2005). Mucke u. a. (2000) entdeckten unter Verwendung verschiedener APP überexprimierender Mauslinien eine inverse Korrelation zwischen der A β -Konzentration und den Synaptophysin-positiven Synapsen im Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus Dentatus. In beiden Studien wurden nicht die Anzahl der Synapsen bestimmt, sondern eine Auswertung der Intensität der Immunfluoreszenz durchgeführt, die sehr anfällig gegen verschiedene Fehlerquellen ist (siehe Abschnitt 3.3.2 auf Seite 93). In einer weiteren Studie wurde mit stereologischen Methoden eine Reduktion der Synaptophysin-positiven Synapsen in mehreren Regionen des Hippocampus gemessen (Rutten u. a., 2005). Das Ergebnis ließ ebenfalls einen Zusammenhang mit der A β -Konzentration vermuten, da nur eine zweifach transgene Mauslinie, die ein mutiertes humanes APP und ein mutiertes PS-1 in Kombination exprimierten, eine Reduktion der Synapsendichte aufwies. Dagegen reichte die Expression beider Transgene alleine nicht für eine Reduktion der Synapsendichte aus.

Ein Vergleich der Dichten von Postsynapsen und Präsynapsen zeigte wesentlich größere Werte für den präsynaptischen Marker (Abb. 2.21 e auf Seite 59). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Synapsin ein ubiquitärer Marker von glutamatergen und GABAergen Präsynapsen ist, während PSD-95 nur in glutamatergen Postsynapsen lokalisiert ist (Bragina u. a., 2007; Micheva u. a., 2010). Zudem gab es einen Trend einer erhöhten Dichte von Präsynapsen in der CA1 Region des Hippocampus im Vergleich zum Cortex und dem Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus Dentatus, der aufgrund der niedrigen Individuenzahl der Wildtypiere nicht signifikant war.

Es wurde ein differentieller Effekt der Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins auf die Dichte von Postsynapsen und Präsynapsen gemessen. Die Dichte der Postsynapsen war im visuellen Cortex und dem Stratum radiatum der CA1 Region des Hippocampus reduziert, während für Präsynapsen keine Unterschiede detektiert wurden. Für eine Bestätigung des Befundes der Postsynapsen sollten zur genaueren Quantifizierung stereologische Methoden in Kombination mit einer höheren Individuenzahl angewendet werden. Diese Ergebnisse fügen sich in ein sehr heterogenes Bild zur Pathologie von Synapsen in Alzheimer-Mausmodellen ein. In Kombination mit den publizierten Befunden aus der Literatur ist ein marginaler Synapsenverlust durch die Überexpression des Amyloid-Vorläuferproteins festzustellen, im Gegensatz

zum robusten Synapsenverlust in Alzheimer-Patienten. Diese Tiermodelle rekapitulieren vermutlich frühe Aspekte der präklinischen, pathologischen Veränderungen während der Ätiologie der Erkrankung bei Alzheimer-Patienten (Holtzman u. a., 2011b). Dadurch ist eine einfache Translation der Ergebnisse auf die humane Pathologie sehr schwierig (Arendt, 2009).

3.3.4 Wirkung amyloider Plaques auf die Synapsendichte

Die Wirkung amyloider Plaques auf die Synapsendichte wurde in den meisten publizierten Studien mit Hilfe von Einzelzellanalysen der dendritischen Spinedichte untersucht, wie in Abschnitt 2.1 auf den Seiten 28–33 beschrieben wurde (Liebscher u. a., 2012). Zusätzlich wurde jeder Dendrit in eine Entfernungskategorie eingeteilt, entweder abseits oder innerhalb einer bestimmten Entfernung (bis zu 50 μm) zu einem amyloiden Plaque. Der Nachteil dieser Methode ist die fehlende genaue Quantifizierung der räumlichen Beziehung von Synapsendichte und amyloiden Plaques, die am besten mit einer Markierung aller Synapsen funktioniert. Die korrelative Analyse der Dichte von Prä- und Postsynapsen in Abhängigkeit von der Entfernung zu amyloiden Plaques, wie sie hier vorgestellt wurde, ist neuartig.

Innerhalb amyloider Plaques wurden nahezu keine Synapsen detektiert, unabhängig ob prä- oder postsynaptischen Ursprungs (Abb. 2.22 a auf Seite 61). Korrespondierende Ergebnisse wurden für Präsynapsen in Alzheimer-Patienten und im Alzheimer-Mausmodell berichtet (Lassmann u. a., 1993, 1992). In einem Alzheimer-Mausmodell wurde das gleiche Resultat für Postsynapsen publiziert (Koffie u. a., 2009). Außerhalb der Grenzen amyloider Plaques stieg die Synapsendichte stark an und näherte sich asymptotisch einem Plateau. Der Verlauf der Synapsendichte in Abhängigkeit von der Entfernung zum amyloiden Plaque konnte sehr präzise mit einer einphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion beschrieben werden. Zum Vergleich der Dichten von Prä- und Postsynapsen wurde die Halbwertsdistanz als charakteristischer Parameter verwendet, bei der die Hälfte der Synapsendichte zwischen Plateau und minimaler Synapsendichte innerhalb des Plaques erreicht wurde. Interessanterweise unterschieden sich die Halbwertsdistanzen von Prä- und Postsynapsen wesentlich, mit 5 μm für Synapsin und 3 μm für PSD-95 (Abb. 2.22 a). Daraus folgte, dass die Präsynapsen sensibler auf die toxische Wirkung amyloider Plaques reagieren. Der komplette Einflussbereich eines amyloiden Plaques, definiert als Abstand in dem 95 % des Plateaus der Synapsendichte erreicht wurden, verdeutlichte den Unterschied zwischen beiden synaptischen Kompartimenten. Für die

Präsynapsen betrug der mittlere Einflussbereich 22 μm und für die Postsynapsen 12 μm . Bei der Ausdehnung eines amyloiden Plaques im dreidimensionalen Raum ist der Unterschied im Einflussvolumen bedeutend, da der Einflussbereich mit der dritten Potenz eingeht. Die Halbwertsdistanzen beider synaptischer Marker korrelierten mit dem Radius der amyloiden Plaques (Abb. 2.22 b, c auf Seite 61). Mit zunehmendem Plaqueradius stiegen die Halbwertsdistanzen an und für Plaqueradien ab 10 μm schwankten die Werte um ein Plateau. Der Zusammenhang zwischen beiden Parametern konnte sehr gut mit einer einphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion beschrieben werden. Deren Plateaus lagen bei 3,8 μm für PSD-95 und 6,4 für Synapsin. Dieses Ergebnis erklärte die unterschiedlichen mittleren Halbwertsdistanzen für Prä- und Postsynapsen und zeigte zusätzlich, dass es zwei unterschiedlich hohe maximale Einflussbereiche für die beiden synaptischen Marker gab. Durch die gleichzeitige Färbung beider synaptischen Marker konnten die Halbwertsdistanzen für Prä- und Postsynapsen direkt miteinander verglichen werden. Es wurde eine positive Korrelation gemessen, d.h. je größer die Halbwertsdistanz der Präsynapsen war, desto größer war die Halbwertsdistanz der Postsynapsen (Abb. 2.23 d auf Seite 63). Zusätzlich zeigte die Lage der Punkte im Vergleich zu einer theoretischen Geraden gleicher Werte, dass die Halbwertsdistanzen und damit der Einflussbereich der amyloiden Plaques für Präsynapsen größer war als für Postsynapsen. Die Hypothese von sensibleren Präsynapsen gegenüber der toxischen Wirkung amyloider Plaques im Vergleich zu den Postsynapsen wurde durch diese Befunde weiter gestärkt.

In einem anderen Mausmodell wurde ebenfalls die Dichte von PSD-95 positiven Postsynapsen in Abhängigkeit zur Entfernung von amyloiden Plaques mit einem ähnlichen experimentellen Aufbau untersucht. Koffie u. a. (2009) beschrieben einen linearen Anstieg der Synapsendichte ausgehend vom Inneren der amyloiden Plaques. In einer Entfernung von 11 bis 20 μm war die Synapsendichte unterhalb derer aus einer Kontrollregion des Cortex, d.h. der gemessene Einfluss amyloider Plaques war wesentlich größer als in dieser Studie. Ein genauer Vergleich der Auswertungsmethodik beider Studien könnte eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz geben. (1) Koffie u. a. (2009) selektierten die Bildvolumina in Abhängigkeit zur Entfernung des amyloiden Plaques per Hand mit einer Breite von 10 μm , während in der vorliegenden Arbeit Entfernungsklassen mit einer Breite von 5 μm in der Form des amyloiden Plaques automatisch generiert wurden. (2) Die automatische Detektion der Synapsen von Koffie u. a. (2009) war eine einfache Schwellenwert-basierte

Segmentierung, die für Signale mit einem breiten Dynamikumfang nicht optimal geeignet ist. In Abschnitt 4.4.4 auf Seite 124 wurde die hervorragende Eignung der Anwendung eines Laplace-Operators demonstriert, um einen kanten-schärfenden Effekt zu erzielen. Der direkte Vergleich beider Methoden zeigte diesen Unterschied sehr deutlich (Abb. 4.6 auf Seite 126). (3) Koffie u. a. (2009) detektierten 8890 Postsynapsen um zwölf amyloide Plaques in drei Mäusen. In dieser Studie wurden mit der automatischen Analyse mehr als doppelt so viele Synapsen in nur einem Bild mit einem Plaque detektiert. Insgesamt wurden die Prä- und Postsynapsen um 60 Plaques von sechs Mäusen untersucht. Die starken Unterschiede in der Methodik und Statistik sind wahrscheinlich der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse beider Studien.

Die Analyse der Synapsendichte in Relation zur Entfernung amyloider Plaques wurde auch für die beiden mit therapeutischen Antikörpern behandelten Gruppen durchgeführt. Es wurde kein Unterschied in der mittleren Plaquegröße zwischen allen drei Gruppen gemessen, d.h. die untersuchten Plaquepopulationen unterschieden sich nicht (Abb. 2.23 a auf Seite 63). Für den Vergleich der Gruppen wurden die zuvor beschriebenen charakteristischen Parameter der asymptotischen Regressionskurven herangezogen. Die Plateaus der nichtlinearen Regressionen, die die Synapsendichte abseits der amyloiden Plaques repräsentierten, waren höher für die mit den therapeutischen Antikörpern behandelten Gruppen (6G1, A-887755) im Vergleich zur Kontrollgruppe (IgG2a, Abb. 2.23 b, c). Dagegen wurde kein Einfluss der Therapie auf die Halbwertsdistanzen, die den Einflussbereich der amyloiden Plaques auf die Synapsendichte widerspiegeln, für beide synaptischen Marker gemessen. Das war ein zu erwartendes Ergebnis, da die Wachstumskinetik ebenfalls unbeeinflusst von der Therapie war. Daraus konnten folgende Schlüsse gezogen werden: (1) Der Therapieeffekt beider Antikörper bezog sich auf die Regionen abseits von amyloiden Plaques. So wurde der Trend zu niedrigeren Synapsendichten in APP überexprimierenden Mäusen abseits von amyloiden Plaques bestätigt und verifiziert. Statistische Signifikanz wurde durch den Vergleich der charakteristischen Parameter von den asymptotischen Regressionskurven erreicht. Aufgrund der vorgegebenen Form der Funktion konnten kleinere Unterschiede mit statistischer Relevanz gemessen werden. (2) Die Behandlung mit dem Antikörper gegen A β -Oligomere war ausreichend für einen therapeutischen Effekt. Dies war ein indirekter Beweis, dass A β -Oligomere ursächlich für die niedrigeren Synapsendichten waren. Als Kontrollversuch wurde zusätzlich die gleiche Analyse im zerebralen Cortex von Wildtyp-

ren mit Pseudoplaques (von Bildern aus transgenen Mäusen) durchgeführt, um die Plateaus der Synapsendichten in Kontrolltieren zu bestimmen (Abb. 2.23 auf Seite 63). Erwartungsgemäß war in den Wildtyptieren kein Abfall der Synapsendichten zu messen. Für beide synaptischen Marker zeichnete sich das gleiche Bild ab: die Plateaus der Wildtyptiere waren am höchsten, die Plateaus der mit Kontrollantikörper behandelten Gruppe am niedrigsten und die Plateaus der mit therapeutischen Antikörpern behandelten Gruppen befanden sich in der Mitte. Daraus folgte, dass neben den Postsynapsen auch für die Präsynapsen ein pathologischer Befund in Form einer niedrigeren Synapsendichte vorlag. Dieser Trend war bei der Messung der Synapsendichte abseits von amyloiden Plaques erkennbar, aber statistisch nicht signifikant (Vergleich Abb. 2.21 d auf Seite 59 mit Abb. 2.23 c auf Seite 63).

In diesem Abschnitt wurde die Wirkung amyloider Plaques auf die Dichte von Synapsen detailliert untersucht. Innerhalb von amyloiden Plaques wurden nahezu keine Synapsen detektiert. Mit zunehmender Entfernung stieg die Synapsendichte in Form einer asymptotischen Funktion an. Präsynapsen waren wesentlich empfindlicher als Postsynapsen gegenüber der toxischen Wirkung amyloider Plaques, was sich in einem größeren Einflussbereich mit niedrigerer Synapsendichte widerspiegelte. Mit der Bestimmung der Plateaus aus den asymptotischen Regressionskurven, die die Synapsendichten abseits von amyloiden Plaques repräsentierten, wurde eine höhere Sensitivität zur Messung von Unterschieden erreicht. Daraus folgend wurden für Prä- und Postsynapsen niedrigere Synapsendichten in AD-transgenen Mäusen gemessen. Dieser pathologische Befund konnte mittels Immuntherapie teilweise aufgehoben werden. Es reichte eine Neutralisierung der A β -Oligomere für einen Therapieerfolg aus, weshalb A β -Oligomere ursächlich für diese Synapsenpathologie waren.

3.3.5 Lokalisation verschiedener A β -Aggregate *in vivo*

Eine weitere Anwendung der therapeutischen Antikörper war, die Lokalisierung von A β -Oligomeren und anderen A β -Aggregaten im Gehirn lebender AD-transgener Mäuse mittels Intravitalmikroskopie zu untersuchen. Die Applikation im lebenden Gewebe hatte den Vorteil, dass die Moleküle in ihrer natürlichen Umgebung ohne chemische Modifizierung durch Fixierung detektiert wurden. Durch eine sequentielle *in vivo* Färbestrategie wurde sichergestellt, dass kein Signal des blauen Fluoreszenzfarbstoffes für amyloide Plaques (Methoxy-X04) in dem Detektionskanal der rotmarkierten Antikörper (Alexa594) gemessen wurde (sogenanntes „Durchbluten“). Dabei wurde zuerst die Färbung des Antikörpers aufgenommen. Anschließend wur-

de das fibrilläre A β -Peptid amyloider Plaques gefärbt und die gleichen Positionen im Gehirn erneut mikroskopiert. Der pan-A β Antikörper 6G1 zeigte eine komplette Kolokalisation mit der Färbung amyloider Plaques durch Methoxy-X04. An den meisten Plaques wurde eine Korona um den amyloiden Kern gefärbt, der aus nicht-fibrillären und wahrscheinlich löslichen A β -Peptiden und/oder A β -Aggregaten bestand. Zudem wurden Akkumulationen ohne amyloiden Kern beobachtet, sogenannte diffuse Plaques. Der 6G1 Antikörper zeigte *ex vivo* das gleiche Färbungsmuster wie der 6E10 Antikörper, der in der humanen Diagnostik verwendet wird (Hillen u. a., 2010). Zudem wurde mit einem weiteren sehr ähnlichen Antikörper (10D5) die gleichen Strukturen *in vivo* angefärbt (Bacsikai u. a., 2001). Der A β -Oligomer-spezifische Antikörper und der Kontrollantikörper, der nicht an A β -Peptide bindet, akkumulierten ausschließlich im amyloiden Kern von Plaques ohne Bildung einer Korona. Aufgrund des Signals durch den Kontrollantikörper musste von einer unspezifischen Bindung beider Antikörper ausgegangen werden, vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen an der großen Oberfläche des β -Amyloid und dessen amorpher Struktur (Cruz u. a., 1997). Die Bindung des A β -Oligomer-spezifischen Antikörpers an amyloide Plaques wurde nicht in fixierten Gehirnschnitten beobachtet, was auf unterschiedliche Bindungseigenschaften von lebendem und fixiertem Gewebe schließen ließ (Hillen u. a., 2010). Das Signal des A β -Oligomer-spezifischen Antikörpers war größer als das Signal des Kontrollantikörpers, aber eine vergleichbare, quantitative Intensitätsmessung der Fluoreszenz war nicht möglich, sodass dies keinen Nachweis einer spezifischen Akkumulation von A β -Oligomeren darstellte. Diese Beobachtung war nicht in Übereinstimmung mit einer Studie von Koffie u. a. (2009), in der eine Lokalisation von A β -Oligomeren im amyloiden Kern mit einer Korona berichtet wurde. Koffie u. a. (2009) verwendeten einen Antikörper zur Detektion von A β -Oligomeren, der auch monomeres und fibrilläres A β -Peptid detektierte (E. B. Lee u. a., 2006). Weiterhin wurde kein Vergleich mit einem Kontrollantikörper zum Ausschluss unspezifischer Wechselwirkungen durchgeführt. Mit der verwendeten *in vivo* Antikörperfärbung ließen sich nur Akkumulationen von Molekülen nachweisen, da immer ein Hintergrundsignal des Färbeantikörpers vorhanden war, der durch das Neuropil diffundierte. Aufgrund des relativ niedrigen Molekulargewichtes stellten A β -Oligomere lösliche Aggregate dar, die ebenfalls durch das Neuropil diffundieren könnten. Demzufolge war das vorgestellte Ergebnis keine unerwartete Konsequenz.

3.3.6 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde eine passive Immunisierung mit einem A β -Oligomer-spezifischen Antikörper (A-887755) im Vergleich zu einem an jede Form des A β -Peptids bindenden Antikörper (6G1) hinsichtlich zweier Aspekte untersucht: (1) den Einfluss auf die Wachstumskinetik amyloider Plaques und (2) den Einfluss auf die synaptische Pathologie, die zusätzlich retrospektiv *post mortem* analysiert wurde. Eine dritte Anwendung dieser Antikörper war die Lokalisation von A β -Oligomeren im lebenden Gehirn AD-transgener Mäuse.

Ein sicherer Nachweis durch die direkte *in vivo* Visualisierung von A β -Oligomeren konnte nicht erbracht werden. Der an jede Form von A β -Peptiden bindende Antikörper 6G1 zeigte eine komplette Kolo-kalisation mit dem amyloiden Kern von Plaques, sowie eine Korona aus löslichen Monomeren und Aggregaten des A β -Peptids. Zusätzlich wurden mit diesem Antikörper diffuse Plaques detektiert, die kein fibrilläres A β -Peptid enthielten.

Die Entstehungs- und Wachstumskinetik wurde nicht moduliert durch die Therapie beider Antikörper bei einer Applikationsdauer von acht Wochen in der dynamischen Phase der amyloiden Pathologie.

Zur retrospektiven Untersuchung der synaptischen Pathologie wurde eine dreifache histochemische Fluoreszenzfärbung für Prä- und Postsynapse (synaptische Marker: Synapsin und PSD-95), sowie für amyloide Plaques (Methoxy-X04) etabliert. Zusätzlich wurde ein automatischer und sehr robuster Algorithmus zur Synapsendetektion in optischen Schnittbildern adaptiert. Für eine Analyse der Synapsendichte in Abhängigkeit von der Entfernung zu amyloiden Plaques wurde dieser Algorithmus ebenfalls in eine entsprechende automatische Auswerterroutine implementiert. Auf das etablierte Protokoll können in zukünftigen Studien stereologische Methoden angewendet werden, um die Genauigkeit der Messungen zu verbessern bzw. die Bestimmung einer absoluten Synapsenzahl in einer Gehirnregion zu ermöglichen.

Innerhalb amyloider Plaques wurden sehr niedrige Synapsendichten (nahe Null) gemessen, die mit zunehmender Entfernung zum Plaque asymptotisch zu einem Plateau anstiegen. Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass der Einflussbereich der toxischen Wirkung amyloider Plaques für Präsynapsen wesentlich größer war als für Postsynapsen. Daraus folgt eine höhere Sensibilität von Präsynapsen gegenüber der toxischen Wirkung amyloider Plaques. Die Dichten von Präsynapsen und Postsynapsen im zerebralen Cortex waren abseits amyloider Plaques niedriger in AD-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-tieren, wie durch den Vergleich der

Plateaus gemessen wurde. Beide therapeutischen Antikörper zeigten eine partielle Normalisierung der Synapsendichte. Folglich waren die A β -Oligomere ursächlich für die Synapsenpathologie, da eine Neutralisierung dieser molekularen Untergruppe der A β -Aggregate für einen Therapieeffekt ausreichte. Die gemessenen Therapieeffekte waren sehr niedrig, sodass eine weitere Verifizierung der Ergebnisse sinnvoll wäre. Zudem waren die Unterschiede der Synapsendichten zwischen AD-transgenen Mäusen und Wildtypieren sehr gering im Vergleich zu den berichteten Synapsenverlusten von 25 % bis 55 % für Alzheimer-Patienten (Arendt, 2009). Dies bestätigte die Annahme, dass diese Tiermodelle vermutlich frühe Aspekte der präklinischen, pathologischen Veränderungen während der Ätiologie der Erkrankung bei Alzheimer-Patienten rekapitulieren (Holtzman u. a., 2011b). Dadurch ist eine Translation der Ergebnisse auf die humane Pathologie sehr schwierig (Arendt, 2009).

Kapitel 4

Material und Methoden

4.1 Transgene Mäuse und deren Genotypisierung

4.1.1 Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsien

Die Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien für die Genotypisierungen erfolgte mit dem pegGold Tissue DNA Mini Kit (Peqlab) in 96-well Platten entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Biopsien wurden über Nacht in 400 µl Lyse-Puffer mit ProteinaseK und RNase bei 50° C inkubiert. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 10.000 U/min (Eppendorf Zentrifuge 5804) wurden zum Überstand 400 µl DNA-Bindpuffer pipettiert, die Säulen (PerfectBind DNA Column) beladen und erneut zentrifugiert (eine Minute, 10.000 U/min). Die Elution der genomischen DNA mit 200 µl Elutionspuffer (drei Minuten Inkubation und eine Minute Zentrifugation bei 6.000 U/min) erfolgte nach zweimaligem Waschen (Waschpuffer, eine Minute Zentrifugation bei 10.000 U/min). Die isolierte Mausschwanz-DNA wurde bei 4° C gelagert.

4.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Für die Genotypisierung der verschiedenen Mauslinien wurden entsprechende DNA-Sequenzen mittels PCR (polymerase chain reaction) amplifiziert, mit denen eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Genotypen möglich war. In den einzelnen Abschnitten zu den verschiedenen Mauslinien sind die einzelnen Primer mit den PCR-Ansätzen und dem PCR Programm aufgeführt. Die PCRs wurden mit Thermocyclern der Firma Eppendorf (Mastercycler pro) durchgeführt.

4.1.3 YFP-H

Diese transgene Mauslinie wurde von Jackson Laboratory bezogen und auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6J wie in der Originalpublikation gezüchtet. Der vollständige Name lautet B6.Cf-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J. In dieser Mauslinie wird das gelb-fluoreszierende Protein YFP (yellow fluorescent protein) unter dem neurosenspezifischen Thy1-Promotor exprimiert, was zu einer spärlichen Fluoreszenzmarkierung hippocampaler und kortikaler Neurone führt (Feng u. a., 2000). Im Cortex exprimieren ausschließlich Schicht II/III und V pyramidale Neurone, sodass deren apikale Dendriten inklusive dendritischer Spines sehr gut mikroskopiert werden können (Holtmaat u. a., 2009; Yang u. a., 2010). Diese Mäuse wurden zur Verkreuzung mit der Mauslinie Tg2576 verwendet.

Tabelle 4.1: Primer, PCR-Ansatz und -Programm für die Thy-1-YFP Genotypisierung

Name	Sequenz 5' → 3'	T _{Hybridisierung} [° C]
IMR 7303	TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA GG	62,4
IMR 9296	CGC TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG	64,2
IMR 8744	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	55,3
IMR 8745	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT	57,3

Volumen [μl]	Produkt	Konzentration [μM]
10	HotMasterMix	
1	IMR 7303	10
1	IMR 9296	10
0,7	IMR 8744	10
0,7	IMR 8745	10
1	Mausschwanz-DNA	
10,6	H ₂ O	

Schritt	Temperatur [° C]	Zeit [s]	Wiederholungen
Denaturierung	94	180	1 x
Denaturierung	94	30	
Hybridisierung	61	60	35 x
Verlängerung	72	45	
Verlängerung	72	60	1 x
Ende	10	-	1 x

4.1.4 Tg2576

Die transgene Mauslinie Tg2576 wurde ursprünglich im Labor von Karen Hsiao generiert und exprimiert ein humanes Amyloid-Vorläuferprotein mit der schwedischen Mutation (APP^{swe}, APP swedish) unter einem Hamster Prion-Protein-Promotor (Hsiao u. a., 1996). Für eine eigene Zucht am Institut wurden zwei Zuchtpaare freundlicherweise von der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden heterozygot auf einem gemischten Hintergrund gezüchtet, der nicht genauer bekannt war. Für die Intravitaluntersuchung dendritischer Spines wurden die Tg2576 Mauslinie mit der YFP-H Mauslinie verkreuzt, deren Tochtergeneration (Männchen und Weibchen) für diese Experimente benutzt wurden. Als Kontrollen dienten Tiere, die nur für YFP positiv waren und ebenfalls aus der Tochtergeneration stammten. Für den Therapieversuch wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, die alle am gleichen Tag geboren wurden.

4. Material und Methoden

Diese Tiere wurden uns freundlicherweise von der Abbott Deutschland GmbH & Co. KG (AG Neuroanatomy) zur Verfügung gestellt und ursprünglich von Taconic Farms Inc. bezogen (vollständiger Name B6;SJL-Tg(APPSWE)2576Kha).

Tabelle 4.2: Primer, PCR-Ansatz und -Programm für die Tg2576 Genotypisierung

Name	Sequenz 5'→3'	$T_{\text{Hybridisierung}} [^{\circ}\text{C}]$
IMR 3610	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG	61,4
IMR 3611	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T	58,8
IMR 8744	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	55,3
IMR 8745	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT	57,3

Volumen [μl]	Produkt	Konzentration [μM]
10	HotMasterMix	
1	IMR 3610	20
1	IMR 3611	20
0,7	IMR 8744	20
0,7	IMR 8745	20
2	Mausschwanz-DNA	
9,6	H ₂ O	

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	Wiederholungen
Denaturierung	94	180	1 x
Denaturierung	94	30	
Hybridisierung	52	60	35 x
Verlängerung	72	60	
Verlängerung	72	120	1 x
Ende	10	-	1 x

4.1.5 CX₃CR1-GFP

Diese Knock-In-Mauslinie wurde uns freundlicher von Prof. Dr. Fritjof Helmchen (ETH Zürich) zur Verfügung gestellt. Durch den Knock-In wurde ein Allel des Fraktalkinrezeptors CX₃CR1 durch das Gen des grün fluoreszierenden Proteins GFP ersetzt (S. Jung u. a., 2000). Der Fraktalkinrezeptor wird im Gehirn ausschließlich von Mikroglia exprimiert, sodass eine spezifische fluoreszente Markierung des Zelltyps bewirkt wurde. Für die Experimente wurden heterozygote Mäuse verwendet, um die physiologische Funktion des Rezeptors durch Expression eines Allels zu erhalten.

Tabelle 4.3: Primer, PCR-Ansatz und -Programm für die CX₃CR1-GFP Genotypisierung

Name	Sequenz 5' → 3'	T _{Hybridisierung} [° C]
IMR 3945	TTC ACG TTC GGT CTG GTG GG	61,4
IMR 3946	GGT TCC TAG TGG AGC TAG GG	61,4
IMR 3947	GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG	61,4

Volumen [µl]	Produkt	Konzentration [µM]
10	HotMasterMix	
1	IMR 3945	10
1	IMR 3946	10
1	IMR 3947	10
1	Mausschwanz-DNA	
11	H ₂ O	

Schritt	Temperatur [° C]	Zeit [s]	Wiederholungen
Denaturierung	95	900	1 x
Denaturierung	95	30	
Hybridisierung	60	30	35 x
Verlängerung	68	120	
Verlängerung	68	600	1 x
Ende	4	-	1 x

4.1.6 Auftrennung der DNS-Fragmente mittels Gelelektrophorese

Die Amplifikate aus der PCR wurden auf Sybr-Gold-Agarosegelen (YFP-H, Tg2576 1 %iges und CX₃CR1-GFP 1,5 %iges Agarosegel) elektrophoretisch aufgetrennt (Gelkammer von C.B.S. Scientific). Das Muster der Banden von den einzelnen Proben wurden mit einem Kamerasystem (Canon Powershot G1, Software: Remote-Capture) auf einem UV-Tisch (3UV Transilluminator, UVP) dokumentiert. Das Bandenmuster für die verschiedenen Genotypen der Mauslinien wurden in Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite exemplarisch dargestellt. Bei den Genotypisierungen der Mauslinien YFP-H und Tg2576 wurde eine interne Kontrolle mitgeführt (Interleukin bei 200 bp), die immer sichtbar sein musste, ansonsten hatte die PCR oder die DNA-Aufreinigung nicht funktioniert. Die jeweilige Bande des Transgens bei 300 bp (YFP-H) oder 377 bp (Tg2576) ermöglichten die Unterscheidung zwischen Wildtyptieren (ohne Bande) und transgenen Tieren (Abb. 4.1 a, b). In der Mauslinie CX₃CR1-GFP konnten drei Genotypen unterschieden werden. Eine Bande bei

4. Material und Methoden

970 bp indizierte Wildtyptiere, die zwei Allele des CX₃CR1-Gens besaßen. Wenn zwei Banden, bei 970 bp und 1100 bp erschienen, war ein Allel des CX₃CR1-Gens durch das Gen von GFP ausgetauscht. Wenn nur eine Bande mit 1100 bp generiert wurde, waren zwei Allele des GFPs vorhanden und das CX₃CR1-Gen war komplett verloren (Abb. 4.1 c).

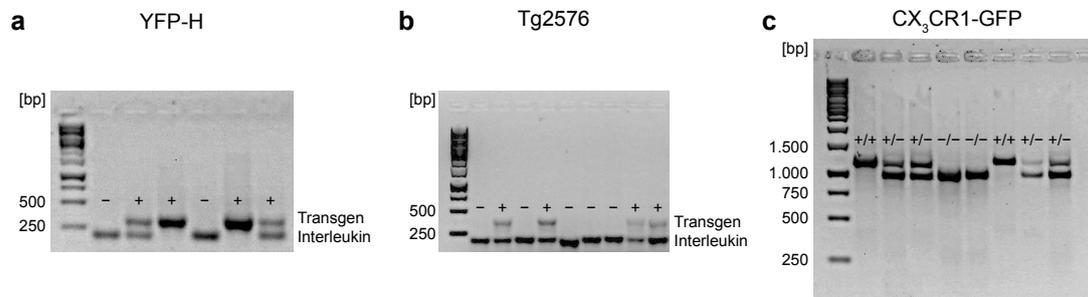


Abb. 4.1: Darstellung der Bandenmuster zur Genotypisierung der Mauslinien. Die interne Kontrolle Interleukin (200 bp) indizierte, ob die PCR und die DNA-Aufreinigung funktioniert hatte (**a** und **b**). Die jeweilige Bande des Transgens bei 300 bp (YFP-H, **a**) oder 377 bp (Tg2576, **b**) ermöglichten die Unterscheidung zwischen Wildtyptieren (ohne Bande) und transgenen Tieren. In der Mauslinie CX₃CR1-GFP konnten drei Genotypen unterschieden werden (**c**). Eine Bande bei 970 bp indizierte Wildtyptiere, die zwei Allele des CX₃CR1-Gens besaßen. Wenn zwei Banden, bei 970 bp und 1100 bp erschienen, war ein Allel des CX₃CR1-Gens durch das Gen von GFP ausgetauscht. Wenn nur eine Bande mit 1100 bp generiert wurde, waren zwei Allele des GFPs vorhanden und das CX₃CR1-Gen war komplett verloren.

4.1.7 Maushaltung

Alle Mäuse wurden in Standard-IVC-Käfigen (individual ventilated cage) spezifiziert pathogen-frei (SPF) in Gruppen bis zu sechs Tieren, nach Geschlecht getrennt und mit einem zwölf Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Futter (Sniff) und Wasser (autoklaviert). Mit einem Alter von drei Wochen wurden Jungtiere abgesetzt, mit einer Ohrmarkierung versehen und für die Genotypisierung wurde eine Schwanzbiopsie entnommen. Die Zucht und die Haltung der Mäuse bis zum Experiment erfolgten in einer zentralen Tierhaltung. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde jeden Tag durch Sichtkontrolle geprüft. Mindestens einen Tag vor der Implantation eines kranialen Fensters wurden Mäuse für das Experiment in eine externe, kleinere Tierhaltung überführt. Spätestens nach der Operation wurden alle Tiere einzeln in einem Käfig gehalten.

Für den Umgang mit Tieren galt der Grundsatz, möglichst stressfrei mit den Tieren umzugehen und die Schmerzbelastung auf ein Minimum zu reduzieren. Es wurde

entsprechend den Richtlinien des Instituts „Zentrum für Neuropathologie“ der LMU München und der Regierung von Oberbayern (Sachgebiet 54 - Tierschutz) gearbeitet. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden durch den Antrag zu dem Tierversuchsvorhaben Az. 55.2-1-54-2531-110-06 geprüft und genehmigt.

4.2 Intravitalmikroskopie

4.2.1 Implantation eines kranialen Fensters

Die Implantation des kranialen Fensters mit Öffnung der Schädeldecke (open skull Methode) entsprach dem im Labor etablierten Protokoll von Martin Fuhrmann (Fuhrmann u. a., 2007). Vor der Operation wurden die runden Deckgläser (Durchmesser 5 mm, Menzel) mit Ethanol gesäubert und zusammen mit dem Operationsbesteck (Fine Science Tools, FST) sterilisiert (Hot Bead Sterilizer, FST). Die Maus wurde gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion mit einem Ketamin/Xylazin-Gemisch (0,14 mg/g Ketamin, WDT; 0,01 mg/g Xylazin, Bayer health Care) anästhesiert. Die Tiefe der Narkose wurde durch Kneifen in den Fuß des Hinterlaufes der Maus (Zwischenzehenreflex) überprüft. Zur Unterstützung der Narkose wurde in manchen Fällen eine Isofluran-Inhalationsanästhesie (Abbott; Isofluranverdampfer: Trajan808, Dräger) eingesetzt. Während der Operation wurde die Maus durch ein Heizkissen (FST) gewärmt. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde Bepanthen aufgetragen. Der Kopf der Maus wurde in einem selbstgebauten Stereotakten fixiert und mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Unter einem Stereomikroskop (Olympus SZ51 mit Kaltlichtschwanenhalslampe KL1500LED) wurde die Kopfhaut mit Schere und Pinzette großflächig über der Schädeldecke entfernt, ohne dabei Muskelgewebe zu verletzen. Lose Haare wurden entfernt und der Schädelknochen mit Pinzette und Skalpell gesäubert. Zusätzlich wurde mit dem Skalpell die Schädeloberfläche aufgeraut und mit einer Schicht Dentalkleber (Cyano Veneer, Hager Werken) überzogen. Die Stelle für das kraniale Fenster wurde ausgespart. Über dem somatosensorischen Cortex wurde mit einem Dentalbohrer (Schick C1-Master, Weithas; mit rundem Stahlbohrer, Komet) kreisrund mit einem Durchmesser von 5 mm die Kraniotomie angedeutet und der Schädelknochen durch vorsichtiges Bohren soweit ausgedünnt, dass sich eine Bruchlinie deutlich über dem gesamten Kreis abzeichnete. Knochenspäne wurden regelmäßig entfernt und Blut mit sterilen Wattestäbchen (Böttger) aufgesogen, um freie Sicht auf den Schädelknochen während des Bohrens zu haben. Über der Kraniotomie wurde ein

Tropfen steriles PBS gesetzt und das kreisrunde Stück Schädelknochen sehr vorsichtig mit einer Pinzette abgehoben. Das freigelegte Areal wurde gesäubert und mit sterilem PBS gespült, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gehirnoberfläche immer befeuchtet war. Stärkere Blutungen am Rand des Fenster wurden mithilfe von hämostatischem Schwamm-Material (Gelfoam, Pfizer) gestillt. Ein Deckglas wurde mit einem Tropfen sterilem PBS versehen, einfassend auf der Öffnung platziert und überflüssiges PBS unter dem Fenster mit sterilen Watteschwämmchen (Sugi, Kettenbach) abgesaugt. Mit frisch angefertigtem Dentalzement (Cyano Veneer, Hager Werken) wurde das Fenster an einigen Punkten fixiert, bevor die gesamte freigelegte Schädeldecke mit dem Zement eingekleidet wurde. Zur späteren Fixierung der Maus unter dem Mikroskop wurde ein spezial-angefertigtes Metallplättchen mit Gewinde und Schraube parallel zur Oberfläche des Fensters ausgerichtet und in den Zement eingearbeitet. Nach der Operation wurden Carprophen (7,5 µg/g, Pfizer) und Cefotaxim (0,25 mg/g, Pharmore) zur analgetischen bzw. antibiotischen Behandlung subkutan verabreicht. Es wurde versucht, die Operation innerhalb einer Stunde durchzuführen. Bis zur vollständigen Erholung von Operation und Narkose, typischerweise ein bis zwei Stunden, wurden die Mäuse weiter gewärmt. Um die Kraniotomie abheilen zu lassen, wurde bis zum ersten Mikroskopie-Zeitpunkt drei bis vier Wochen gewartet.

4.2.2 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die Experimente zur Untersuchung dendritischer Spines *in vivo* inklusive der initialen Messung der Wachstumskinetik amyloider Plaques wurden an einem aufrechten Mikroskop mit einem Axioskop 2Fs mot Stativ in Verbindung mit einem LSM510Meta/NLO Setup (Zeiss) durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein spektral abstimmbarer Ti:Sa-Laser (710-920 nm, MaiTai XF-W1S, Spectra-Physics). Weiterhin war das Mikroskop mit einem motorisierten x-y-Tisch (380 FM, Luigs und Neumann), Standard Photomultipliern (Hamamatsu) und einem W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC Objektiv (Zeiss) ausgestattet. Das Mikroskop wurde mit der dazugehörigen Software Zeiss AIM Version 4.2 gesteuert. Die Fluoreszenzanregung von YFP (Dendriten mit Spines) und Methoxy-X04 (amyloide Plaques) erfolgte mit 880 nm bzw. 750 nm. Die emittierte Fluoreszenz wurde durch den Hauptfarbteiler (dichroitischer Spiegel, Kurzpass 650, Zeiss) von dem Anregungslicht getrennt und durch einen NebenfARBteiler (Langpass FT506hq, AHF Analysetechnik) auf die beiden Detektoren verteilt. Die emittierte Fluoreszenz von YFP und Methoxy-X04

wurde mit den Bandpässen 555/55 nm (YFP, AHF) und 480/40 nm (Methoxy-X04, AHF) vor den Detektoren gemessen.

Alle weiteren Experimente zur Untersuchung der Plaquewachstumskinetik, inklusive dem Therapieversuch und der Lokalisation verschiedener A β -Aggregate *in vivo* wurden an einem LSM 7 MP in Kombination mit einem Axio Examiner.Z1 Stativ (Zeiss) durchgeführt. Dieses Stativ verfügte über einen in die Mikroskopsoftware (Zen2009/Zen2010 64bit, Zeiss) integrierten und motorisierten x-y-Tisch, wodurch die „TileScan“-Funktion benutzt werden konnte. Diese Funktion ermöglichte das automatische Zusammensetzen von mehreren 3D-Bildstapeln zu einem großen gesamten Volumen. Als Lichtquelle diente ein Ti:Sa-Laser MaiTai DeepSee (Spectra-Physics). Für die verwendeten Wellenlängen wurde die optimale Einstellung der DeepSee-Einheit zur Kompensation der Phasenverschiebung aufgrund der Dispersion des Lichtes anhand des Fluoreszenzsignales ermittelt. Diese Einstellung wurde innerhalb eines Experimentes konstant gehalten. Weiterhin war das Mikroskop mit einem W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC Objektiv (Zeiss) ausgestattet. Die emittierte Fluoreszenz wurde durch einen Hauptfarbteiler (dichroitischer Spiegel Kurzpass 690, Zeiss) vom Anregungslicht getrennt. Im Detektionsstrahlengang blockte ein Sperrfilter das Anregungslicht ab (Kurzpassfilter 690, Zeiss). Die beiden Farbstoffe Methoxy-X04 zur Untersuchung der Plaquewachstumskinetik und Antikörpergekoppeltes Alexa594 zur Untersuchung der Lokalisation verschiedener A β -Aggregate *in vivo* wurden jeweils mit 750 nm angeregt. Die emittierten Fluoreszenzen wurden durch die Kombinationen von einem Kurzpass 500 (Zeiss) mit einem Bandpass 460/80 (Methoxy-X04, AHF) oder einem Langpass 585 (AHF) mit einem Bandpass 617/73 (Alexa594, AHF) spektral getrennt und mittels Photomultipliern detektiert.

Für die Intravitaluntersuchungen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie wurden die Mäuse mit Isofluran (Abbott; Isofluranverdampfer: Trajan808, Dräger) anästhesiert und mithilfe des Plättchens mit Gewinde in einer spezial-angefertigten Maushalterung fixiert (Abb. 4.2 a-c auf der nächsten Seite). Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Augen mit Bepanthen (Bayer) bedeckt. Das kraniale Fenster wurde mit einem Skalpell sorgfältig gereinigt und die Halterung mit Maus unter dem Mikroskop positioniert (Abb. 4.2 d). Im Epifluoreszenzmodus des Mikroskops sind die oberflächlichen Blutgefäße sehr gut zu erkennen und deren einzigartiges Muster diente zum Wiederauffinden der Position innerhalb des Fensters. Das Blutgefäßmuster wurde mit einer digitalen Kleinbildkamera über einen Kamerazugang am Mikroskopstativ fotografiert (Abb. 4.2 e). Zum genauen Positionieren wurden jeweils die spezifi-

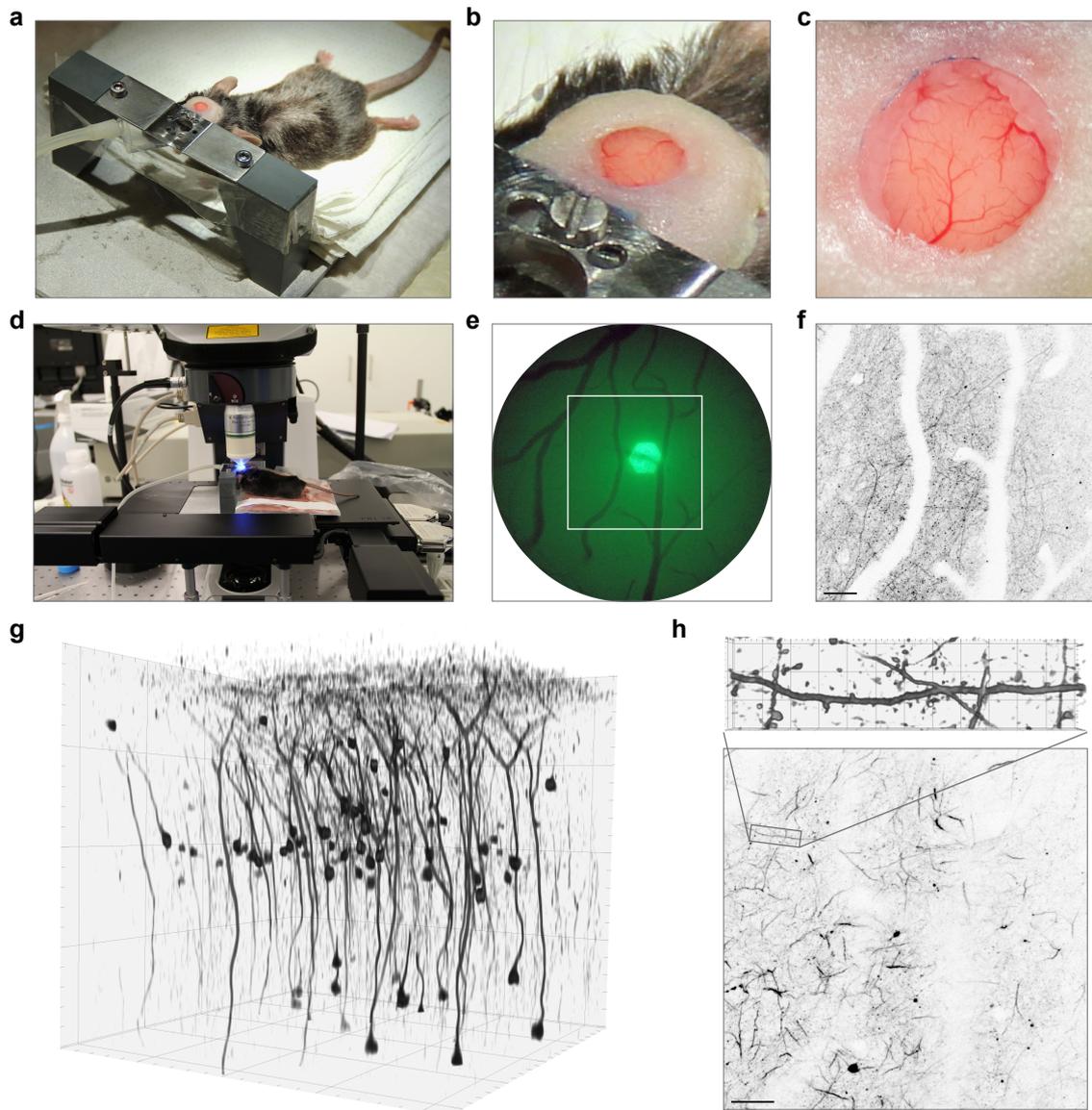


Abb. 4.2: Darstellung der Positionierung zum wiederholten Mikroskopieren einer Gehirnregion in einer lebenden Maus. Die Mäuse wurden mit Isofluran anästhesiert und mit dem Plättchen an einem speziell-angefertigten Maushalter fixiert (**a**, **b**). Eine vergrößerte Aufnahme des kranialen Fensters ein Jahr nach Implantation wurde unter **c** dargestellt. Der Maushalter inklusive Maus wurde unter dem Objektiv auf einem motorisierten Tisch platziert (**d**). Im Epifluoreszenzmodus sind das einzigartige Blutgefäßmuster dieser Position zu sehen, das zum Wiederfinden der Position genutzt wurde (**e**). Eine Aufnahme der gleichen Position mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop wurde in **f** abgebildet. Hier sind die YFP-Fluoreszenz von oberflächlichen Dendriten (grau) und als Negativmuster das gleiche Blutgefäßmuster wie in **e** zu sehen. Zur Unterscheidung der apikalen Dendriten von Schicht II/III und Schicht V Neuronen wurden Übersichtsaufnahmen bis zu 450 μm Tiefe von der Gehirnoberfläche aus akquiriert (**g**). Innerhalb der Übersichten wurden apikale Dendriten für hochauflösende Aufnahmen zur Analyse dendritischer Spines ausgewählt (**h**). Die genaue Repositionierung der Übersichten erlaubte damit das Nachverfolgen einzelner Spines über mehrere Wochen. Die Maßstäbe entsprechen 50 μm in **f** und **h**. In den 3D-gerechneten Bildern entsprechen die Seitenlängen der großen Quadrate 5 μm (**h**) und 100 μm (**g**).

sche Färbung der Maus aus der Übersichtsaufnahme genutzt (Abb. 4.2 e-g). Von den ausgewählten Positionen wurden dreidimensionale Bildstapel als Übersichten in der Größe $425 \times 425 \times 300\text{-}450 \mu\text{m}^3$ mit einer Auflösung von $0,415 \mu\text{m}$ und einem Einzelbildabstand von $3 \mu\text{m}$ aufgenommen. Zur Untersuchung großer Volumina wurden Übersichtsbilder von 2×2 Bildfeldern mit den Dimensionen $850 \times 850 \times 300\text{-}400 \mu\text{m}^3$ mit einer lateralen Auflösung von $0,83 \mu\text{m}$ und einem Einzelbildabstand von $3 \mu\text{m}$ aufgenommen. Dabei wurde die Laserintensität zur Anregung der Fluoreszenz über die Tiefe angepasst. Diese Übersichtsaufnahmen erfassten alle Schicht II/III Neurone, sodass die apikalen Dendriten von Schicht II/III und Schicht V Neuronen durch nachverfolgen bis zum Zellkörper unterschieden werden konnten (Abb. 4.2 h). Weiterhin wurden innerhalb dieser Übersichtsaufnahmen die Dendritenabschnitte lokalisiert, an denen die Daten zu den dendritischen Spines erhoben wurden (Abb. 4.2 g). Um die dendritischen Spines optisch aufzulösen, wurden Bilder im Zoom 6 mit einer lateralen Auflösung von $0,137 \mu\text{m}$ und einem Einzelbildabstand von $1 \mu\text{m}$ aufgenommen. Aufgrund der stufenweisen und dadurch sehr genauen Repositionierung der Übersichtsaufnahmen, konnten einzelne dendritische Spines über mehrere Wochen beobachtet werden. Auf diese Weise wurden 7-15 Dendriten pro Maus mikroskopiert, wobei eine Mikroskopiesitzung nicht länger als eine bis anderthalb Stunden dauern sollte. Es wurde darauf geachtet, dass die Signalintensität der Fluoreszenz innerhalb des mikroskopierten Volumens über die Zeit konstant gehalten wurde.

Amyloide Plaques wurden mit dem synthetischen Fluoreszenzfarbstoff Methoxy-X04 gefärbt, das als Kongorot-Derivat an Proteinaggregate mit einer gekreuzten β -Faltblattstruktur bindet (Klunk u. a., 2002). Der Farbstoff wurde anfänglich in einer Dosis von $2,4 \text{ mg/kg}$ intraperitoneal einen Tag vor der Mikroskopiesitzung injiziert. Eine wiederholte Gabe des Farbstoffs erlaubte die Messung des Wachstums amyloider Plaques über die Zeit. Anschließend wurde die Dosierung reduziert zu einer initialen Dosis von $2,0 \text{ mg/kg}$ vor der ersten Mikroskopiesitzung und darauffolgend wöchentlich von je $0,4 \text{ mg/kg}$. Die Reduzierung der Dosis hatte keinen Einfluss auf das Plaquewachstum, weshalb diese in allen folgenden Experimenten beibehalten wurde (Burgold u. a., 2011). Das verwendete Methoxy-X04 wurde im Labor von Prof. Dr. Boris Schmidt (TU Darmstadt) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4.2.3 Durchführung des Therapieversuchs

Für den Therapieversuch wurden weibliche Tg2576 Mäuse verwendet, die alle am selben Tag geboren wurden. Den Mäusen wurde ein kraniales Fenster zur Intravitaluntersuchung des Plaquewachstums in einem Alter von ungefähr elf Monaten implantiert. Nach drei bis vier Wochen Erholungsphase wurde jeder Maus die initiale Dosis von 2 mg/kg Methoxy-X04 intraperitoneal injiziert. Es wurden drei Therapiegruppen eingeteilt, die entweder mit dem A β -Oligomer Antikörper (A-887755, acht Mäuse), dem pan-A β Antikörper (6G1, sieben Mäuse) oder mit einem unspezifischen Antikörper (IgG2a Isotypkontrolle, die kein A β erkennt, acht Mäuse) als Kontrolle behandelt wurden. Zusätzlich wurde eine vierte Gruppe untersucht, die keiner therapeutischen Behandlung unterzogen wurde. Um einen Einfluss des Experimentators auszuschließen, wurde der Versuch verblindet durchgeführt. Aus logistischen Gründen waren die Gruppen bekannt, aber nicht welcher Antikörper ihnen appliziert wurde. Die Auswertung des Plaquewachstums wurde ebenfalls verblindet durchgeführt. Für eine präzise Messung des Plaquewachstums wurden die Mäuse einmal pro Woche über einen Zeitraum von acht Wochen mikroskopiert. Die wöchentliche Dosis der monoklonalen Antikörper betrug 500 μ g (Hillen u. a., 2010) und wurde direkt nach der Mikroskopiesitzung intraperitoneal injiziert (300 μ l Antikörper à 1,667 mg/ml). Während der Injektion waren die Mäuse noch unter Narkose, sodass sie keinem unnötigen Stress ausgesetzt waren. Die Behandlung wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum von acht Wochen fortgesetzt (entspricht acht Dosen). Für eine möglichst genaue Bestimmung der Plaquedichten und zur Messung der Wachstumskinetik von möglichst vielen Plaques wurden sehr große Volumina mikroskopiert. Zur Umsetzung wurde die „TileScan“-Funktion des Zwei-Photonen-Mikroskops LSM 7 MP (Zeiss) verwendet, die das automatische Zusammensetzen mehrerer Bildfelder ermöglichte. Es wurden Areale von 2x2 Bildfeldern mit den Dimensionen 850 x 850 x 300-400 μ m³ und einer lateralen Auflösung von 0,83 μ m und einem Einzelbildabstand von 3 μ m aufgenommen. Pro Maus wurden drei Positionen mikroskopiert, was sich zu einem untersuchten Gesamtvolumen von über 19 mm³ über alle vier Gruppen integrierte.

4.2.4 In vivo Färbung verschiedener A β -Aggregate

Zur Visualisierung mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Antikörper (6G1, A-887755, IgG2a Isotypkontrolle) mit dem synthetischen Fluorophor Alexa594 ge-

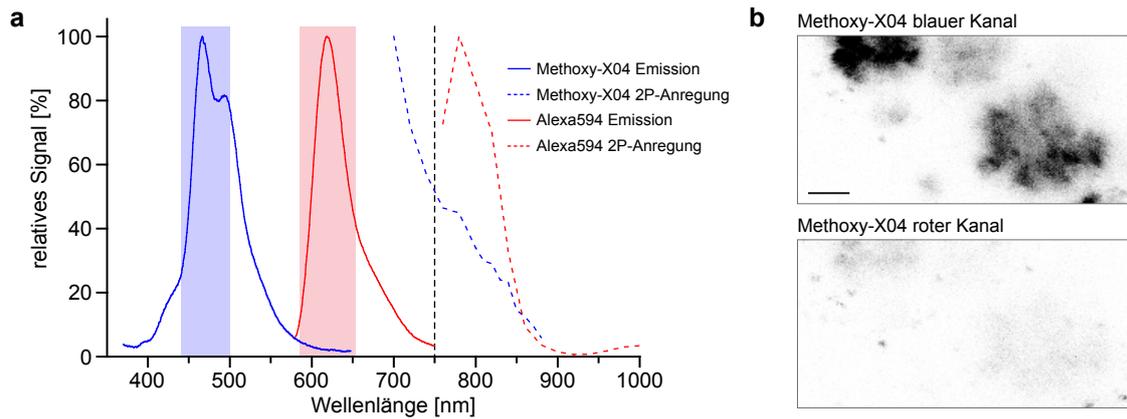


Abb. 4.3: Darstellung der Anregungs- und Emissionsspektren von Methoxy-X04 und Alex594.
a In blau und rot wurden Emissionsspektren von Methoxy-X04 und Alexa594 dargestellt. Durch die farbig hinterlegten Bereiche sind die entsprechenden spektralen Bereiche zur Detektion der Fluorophore markiert. Die gestrichelten Linien zeigen die dazugehörigen Zwei-Photonen-Anregungs-Spektren. Für Methoxy-X04 wurde das Anregungsspektrum *in vivo* gemessen, während das Spektrum für Alexa594 C. Xu u. a. (2008) entnommen wurde. Die Anregung beider Fluorophore wurde mit 750 nm durchgeführt.
b Die starke Fluoreszenz von Methoxy-X04 wurde in beiden Detektionskanälen aus **a** gemessen, wenn auch wesentlich schwächer im roten Kanal zur Detektion von Alexa594. Der Maßstab repräsentiert 20 μm .

koppelt, das einen hohen Wirkungsquerschnitt für die Zwei-Photonen-Anregung besitzt und dadurch sehr gut für die *in vivo* Untersuchung geeignet war (C. Xu u. a., 2008). Die Fluoreszenzmarkierung wurde im Labor von Dr. Stefan Barghorn (Abbott) durchgeführt und die Antikörper zur Verfügung gestellt (Alexa Fluor®594 Protein Labeling Kit, A-10239, Invitrogen). Zur Kontrolle wurde die biochemische Bindungs-Aktivität der monoklonalen Antikörper überprüft und ergab keine Abweichungen nach der Kopplung mit dem Fluorophor. Ein Antikörper wurde mit fünf bis sechs Farbmolekülen markiert. Zur Detektion amyloider Plaques wurde Methoxy-X04 verwendet, das ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 466 nm erreichte. Das Emissionsmaximum von Alexa594 lag mit 618 nm sehr weit entfernt, sodass die Fluoreszenzsignale beider Fluorophore relativ gut, aber nicht perfekt voneinander getrennt werden konnten (Abb. 4.3 auf dieser Seite). Da das Fluoreszenzsignal von Methoxy-X04 aufgrund der großen Mengen an fibrillären A β -Aggregaten innerhalb der Plaques im Vergleich zu dem erwartenden Signal der löslichen A β -Moleküle sehr stark war, wurde eine sequentielle Färbestrategie angewendet. Bei der Implantation des kranialen Fensters wurde die Dura Mater entfernt und eine Lösung der fluoreszenzmarkierten Antikörper ($0,3 \text{ mg ml}^{-1}$) direkt auf die Gehirnoberfläche gegeben. Die Öffnung im Schädel der Maus wurde mit einem Deckglas

verschlossen. Um den Antikörper in das Gehirn diffundieren zu lassen, wurde mit der ersten Mikroskopiesitzung fünf bis sechs Stunden nach der Operation begonnen. Für eine Färbung der amyloiden Plaques wurde Methoxy-X04 (2 mg kg^{-1}) nach der ersten Mikroskopiesitzung intraperitoneal injiziert. Nach 15 bis 17 Stunden Inkubationszeit wurde die zweite Mikroskopiesitzung zur Messung beider Fluorophore begonnen. Von den ausgewählten Positionen wurden dreidimensionale Bildstapel im Zoom 1 als Übersichten in der Größe $425 \times 425 \times 300\text{-}450 \mu\text{m}^3$ mit einer Auflösung von $0,415 \mu\text{m}$ und einem Einzelbildabstand von $3 \mu\text{m}$ aufgenommen. Die Repositionierung bei der zweiten Aufnahme wurde durchgeführt, wie im Abschnitt 4.2.2 auf Seite 112 beschrieben.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Transkardiale Perfusion

Für die Perfusion von Gehirngewebe wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus Ketamin/Xylazin ($0,14 \text{ mg/g}$ Ketamin, WDT; $0,01 \text{ mg/g}$ Xylazin, Bayer health Care) anästhesiert und an den Gliedmaßen, auf dem Rücken liegend, fixiert. Nacheinander wurden Bauchdecke und Brustkorb geöffnet und das schlagende Herz freigelegt. Eine Flügelkanüle wurde in die linke Herzkammer gestochen, über die eiskaltes PBS mit einer Pumpe in den Blutkreislauf geleitet wurde. Gleichzeitig wurde das rechte Herzohr geöffnet, um den Ausfluss des Blutes zu gewährleisten. Nachdem der Blutkreislauf vollständig mit PBS gespült war, wurde über ein T-Ventil 4%-iges PFA (4% Paraformaldehyd in PBS) eingeleitet. Die erfolgreiche Fixierung konnte anhand des sich ringelnden Schwanzes und der Versteifung des Mausekörpers kontrolliert werden. Anschließend wurde das Gehirn präpariert und in 4%-igem PFA bei 4°C über Nacht postfixiert. Fixierte Gehirne wurden in PBS bei 4°C gelagert.

4.3.2 Schneiden und immunhistochemisches Färben von Mausgehirnen

In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistologische Präparate für die Quantifizierung der Gliaktivierung unter dem kranialen Fenster und zur Untersuchung der Synapsenpathologie im Tg2576 Alzheimer-Mausmodell angefertigt. Zur Färbung mit Antikörpern wurden koronale Gehirnschnitte mit einem Vibratom (VT1000S, Leica) und einer Dicke von 50 oder $100 \mu\text{m}$ geschnitten. Die Gehirnschnitte wurden in 24-well Platten freischwimmend prozessiert und mindestens über Nacht in

2 % PBS-T (PBS mit 2 % Triton X-100) permeabilisiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Untersuchung der Gliaaktivierung wurden heterozygote CX₃CR1-GFP Mäuse verwendet, die GFP in Mikroglia exprimieren. Zur Verstärkung der GFP-Fluoreszenz wurde ein direkt markierter Antikörper anti-GFP-Alexa488 (1:100, A-21311, Invitrogen) verwendet, während zur Markierung von reaktiven Astrozyten ein biotinylierter anti-GFAP Antikörper (1:500, Klon GA-5, ab79203, Abcam) diente. Alle Inkubationsschritte wurden in Dunkelheit durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluorophore zu vermeiden. Beide Antikörper wurden über Nacht in einer Lösung aus 5 % BSA und 0,1 % PBS-T mit den Gehirnschnitten (100 µm) inkubiert. Danach wurden die ungebundenen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit 0,1 % PBS-T entfernt. Zur Detektion des biotinylierten anti-GFAP Antikörpers wurde ein TSA Kit mit einer Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase und Tyramid-Alexa647 (TSA Kit #26, T-20936, Invitrogen) verwendet. Die Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase wurde 1:200 in 1 % BSA 0,1 % PBS-T verdünnt über Nacht inkubiert und anschließend wurde durch dreimaliges Waschen ungebundenes Reagenz entfernt. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde die Entwicklungslösung des Kits mit dem Tyramid-Alexa647 (1:200) für vier Stunden inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit 0,1 % PBS-T wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und mit „Fluorescent Mounting“ Medium (Dako) eingedeckelt. Die Deckgläser wurden mit Nagellack versiegelt und die Objektträger bei 4° C gelagert. Zur Charakterisierung der Pathologie des Alzheimer-Mausmodells Tg2576 wurde eine Dreifach-Färbung von Mikroglia, Astrozyten (GFAP, wie oben beschrieben) und amyloiden Plaques (Methoxy-X04, wie unten beschrieben) durchgeführt (Abb. 2.1 auf Seite 29). Die Mikroglia wurden mit einem primären Antikörper gegen Iba1 1:200 (Kaninchen, polyklonal, 019-19741, Wako Pure Chemicals Industries) in Kombination mit einem sekundären anti-Kaninchen-Alexa488 Antikörper 1:500 (Ziege, A-21244, Invitrogen) gefärbt. Weiterhin wurde eine Färbung von löslichen und aggregierten A β -Peptiden in Kombination mit amyloiden Plaques (Methoxy-X04) durchgeführt. Dafür wurde der ebenfalls in der humanen Diagnostik angewandte anti-A β -Antikörper 6E10 1:200 (Klon 6E10, monoklonal und biotinyliert, Maus, SIG39340, Covance) in Kombination mit dem zuvor beschriebenen TSA Kit #26 verwendet.

Zur Markierung von Synapsen wurden Antikörper gegen die beiden synaptischen Proteine PSD-95 (Klon 108E10, Maus, monoklonal, 124011, Synaptic Systems) und Synapsin1/2 (Kaninchen, polyklonal, 106002, Synaptic Systems) verwendet. Die

primären Antikörper (PSD-95 1:200, Synapsin 1:500) wurden zwei Tage mit den Gehirnschnitten (50 μm) in einer Verdünnungslösung bestehend aus 10 % normalem Ziegen Serum (NGS, Dako) und 0,3 % PBS-T inkubiert. Anschließend wurde durch dreimaliges Waschen mit der Verdünnungslösung ungebundener Antikörper entfernt. Als Sekundärantikörper dienten anti-Maus-Alexa647 (A-21236, Invitrogen) und anti-Kaninchen-Alexa488 (A-21244, Invitrogen) aus der Ziege. Diese wurden in der Verdünnungslösung (1:500) über zwei Tage mit den Gehirnschnitten inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit der Verdünnungslösung wurden durch eine 15-minütige Inkubation mit 0,01 mg/ml Methoxy-X04 amyloide Plaques gefärbt. Die Schnitte wurden nach weiterem dreimaligen Waschen mit PBS auf Objektträger aufgezogen und mit „Fluorescent Mounting“ Medium (Dako) eingedeckelt. Die Deckgläser wurden mit Nagellack versiegelt und die Objektträger bei 4° C gelagert. Die Detektion mit den sekundären Antikörpern zeigte keine Kreuzreaktivität mit dem jeweiligen anderen Primärantikörper. Zusätzlich wurde eine Färbung des postsynaptischen Marker PSD-95 in Kombination mit dem dendritischen Marker MAP-2 durchgeführt. Dafür wurde dasselbe Protokoll wie zuvor beschrieben durchgeführt und der Antikörper gegen Synapsin durch einen Antikörper gegen MAP-2 (Kaninchen, polyklonal, 188002, Synaptic Systems) ausgetauscht.

4.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Alle Aufnahmen der immunhistochemischen Gehirnschnitte wurden mit einem inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510/NLO (Zeiss) durchgeführt. Die beiden Farbstoffe Alexa488 und Alexa647 wurden gleichzeitig mit einem Argon-Laser (488 nm) und HeNe-Laser (633 nm) über einen Hauptfarbteiler HFT UV/-488/543/633 angeregt. Die Detektion erfolgte über einen Nebenfarteiler NFT 635 und einem Langpass 650 (Alexa647) oder einen Bandpass 525/50 (Alexa488). Bei den verwendeten Einstellungen wurde kein Signal des Alexa488 im roten Kanal des Alexa647 gemessen.

Für die Aufnahmen von Gliazellen wurde ein Plan-Neofluar 10x/0,3 Objektiv (Zeiss) verwendet. Die Lochblende wurde auf eine Airy Einheit eingestellt. Es wurden Bildstapel mit den Dimensionen 900 x 900 x 60-80 μm^3 und einer lateralen Auflösung von 0,879 μm und einem Einzelbildabstand von 3 μm aufgenommen. Die Laserintensitäten wurden angepasst, um möglichst ähnliche Fluoreszenzintensitäten in den verschiedenen Bildstapeln zu generieren. Für die Aufnahmen von Synapsen wurde ein Plan-Apochromat 40x/1,3 Ölimmersionsobjektiv (Zeiss) verwendet, um

eine bestmögliche Auflösung und Bildqualität zu erreichen. Die Lochblende wurde auf eine Airy Einheit eingestellt. Abseits von amyloiden Plaques wurden Bildstapel mit den Dimensionen $74,9 \times 74,9 \times 1,8 \mu\text{m}^3$ mit einer lateralen Auflösung von $0,098 \mu\text{m}$ und einem Einzelbildabstand von $0,3 \mu\text{m}$ aufgenommen. Die Laserintensitäten beider Kanäle wurden so angepasst, dass einige Pixel in den Bildern saturiert waren. Diese Art der Einstellung führte zu gut vergleichbaren Bildern in verschiedenen Gehirnschnitten und kompensierte unterschiedlich starke Färbungen. Für die Aufnahmen von Synapsen um amyloide Plaques wurden Bildstapel mit den Dimensionen $225 \times 225 \times 1,8 \mu\text{m}^3$ und einer lateralen Auflösung von $0,11 \mu\text{m}$, sowie einem Einzelbildabstand von $0,3 \mu\text{m}$ aufgenommen. Zusätzlich wurde ein dritter Kanal zur Detektion der Fluoreszenz von Methoxy-X04 akquiriert. Zur Anregung wurde ein Ti:Sa-Laser (MaiTai HP DeepSee, Spectra-Physics) verwendet, der auf eine Wellenlänge von 750 nm eingestellt wurde. Zur Trennung von Fluoreszenzemission und Anregungslicht wurde ein Hauptfarbteiler HFT 650 (Kurzpass 650) verwendet. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte über einen Bandpass 460/50. Aufgrund der Zwei-Photonen-Anregung wurde die Lochblende maximal geöffnet. Um ein Ausbleichen des Alexa647 durch die Anregung bei 750 nm zu vermeiden, wurde der Bildstapel des Methoxy-X04 Kanals immer separat nach dem Bildstapel der beiden anderen Kanäle aufgenommen.

4.4 Datenauswertung und Bildanalysen

4.4.1 Quantitative Auswertung dendritischer Spines

Für die Datenauswertung zur Dichte, Kinetik und Morphologie dendritischer Spines wurden das Signal-Rausch-Verhältnis und die Detailschärfe der Rohdaten durch Dekonvolution („3D Blind Deconvolution“ Algorithmus mit zehn Iterationen, AutoQuantX2, Media Cybernetics) verbessert. Die Auswertung der Dichte und Kinetik dendritischer Spines erfolgte als drei- oder vierdimensionale Bildstapel in den Programmen LSM Image Browser 4.2 oder Zen2009 light (Zeiss). Alle Daten wurden verblindet ausgewertet. Als Spines wurden die primär lateral von Dendriten abgehenden Strukturen detektiert, die nach eigenem Ermessen die entsprechende Form und Größenordnung hatten. In Zeitserien wurden die Spines eines Dendriten mit dem jeweiligen vorherigen Zeitpunkt verglichen. Für jeden Spine wurde überprüft, ob er bereits präsent, neu entstanden oder verloren gegangen war. Als identisch wurden Spines betrachtet, wenn sich ihre Position entlang des Dendriten nicht mehr als

einen Mikrometer verändert hatte. Zur genauen Positionsbestimmung wurde das charakteristische Muster der zeitlich stabilen Spines genutzt, um neu entstandene und verloren gegangene Spines zu detektieren. Die Länge des ausgewerteten Dendritenabschnittes wurde in der xy-Ebene gemessen (Spline-Funktion) und mittels Satz des Pythagoras für den Raum annähernd berechnet. Alle Daten wurden in Excel-Tabellen erfasst und manuell oder mit selbst angefertigten Routinen ausgewertet.

Die Klassifizierung der dendritischen Spines nach ihrer Morphologie wurde semi-automatisch mit der Software Imaris 6.2.1 (Bitplane) durchgeführt. Es wurde das Skelett der Dendriten mit den Spines, die hauptsächlich lateral verliefen, mit dem Modul FilamentTracer markiert. Eine Segmentierung erfolgte mit einem Kontrast-schwellenwert (0,3) ausgehend vom zuvor detektierten Skelett. Anhand der dreidimensional detektierten Strukturen mit Unterscheidung von Dendriten und Spines wurden die automatisch ermittelten Parameter Spine-Länge (L), Durchmesser des Spine-Kopfes (W_K) und Spine-Halses (W_H) klassifiziert. Es erfolgte eine Einteilung in der Reihenfolge „mushroom“ (m), „stubby“ (s) und „thin“ (t) nach den folgenden hierarchischen Regeln:

$$Spine = \begin{cases} m, & \text{falls } \frac{\max(W_K)}{\min(W_H)} > 1,4 \wedge \max(W_K) > 0,5 \wedge \min(W_H) > 0 \\ s, & \text{falls } \frac{L}{W_H} \leq 3 \vee \min(W_H) = 0 \vee \min(W_H) > 0,5 \\ t, & \text{falls } \frac{L}{W_H} > 3 \end{cases}$$

Für Abbildungszwecke wurden Dendritenabschnitte in Imaris zurechtgeschnitten und teilweise kreuzende andere Dendriten oder Axone entfernt. Dadurch werden nur die für den Betrachter wesentlichen Bildinhalte gezeigt und optische Täuschungen aufgrund der dreidimensionalen Darstellungsweise vermieden.

4.4.2 Quantitative Auswertung von Mikroglia und Astrozyten

Die Detektion und Messung der Zellvolumina von Mikroglia und Astrozyten wurde durch Segmentierung mit dem „Surface“-Modul von Imaris (Version 6.2.1) durchgeführt. Für beide Zelltypen wurde die automatische Schwellenwertbestimmung von Imaris, die sehr gut mit den Aufnahmen funktionierte, und eine Glättung mit einer Oberflächen-Körnung von $1,75 \mu\text{m}$ angewendet. Zusätzlich wurde eine Hintergrundeliminierung unter der Angabe für den größten Durchmesser von $15 \mu\text{m}$ und $10 \mu\text{m}$ für Mikroglia und Astrozyten durchgeführt. Mikroglia wurden in die Auswertung

aufgenommen, wenn ihr Volumen größer $600 \mu\text{m}^3$ betrug, um nur teilweise im Bildvolumen befindliche Zellkörper auszuschließen. Für Astrozyten wurden eine Ausschlußgrenze von $900 \mu\text{m}^3$ festgelegt. Die Auswertung der Zelldichte in Abhängigkeit von der Gehirnoberfläche wurde unter Nutzung der ausgegebenen Positionen der segmentierten Zellobjekte durchgeführt.

4.4.3 Kinetik des Volumens amyloider Plaques

Die Aufnahmen der amyloiden Plaques mit einer Datentiefe von 12 bit wurden als dreidimensionale Zeitserien in der Software Imaris (Version 6.2.1 oder 7.4.2, Bitplane) ausgewertet. Ein Problem in der Auswertung amyloider Plaques stellte die gleichzeitige Aufnahme von Autofluoreszenz dar, wie in der Zeitserie von Abbildung 4.4 a auf der nächsten Seite zu sehen ist (Zipfel u. a., 2003a). Eine initiale Untersuchung der Autofluoreszenz in Wildtyptieren zeigte, dass diese Objekte sehr klein und zeitlich nicht stabil waren. So konnten großvolumige Plaques sehr einfach anhand ihrer Größe identifiziert werden. Neu entstandene, sehr kleine Plaques wurden durch ihre zeitliche Stabilität detektiert. Als neu entstandene Plaques wurden nur Objekte gewertet, die mindestens über drei Wochen an der selben Stelle erkannt wurden. Die Volumina der amyloiden Plaques wurden durch Segmentierung mit dem „Surface“-Modul von Imaris bestimmt. Zuvor wurden die Bildserien mithilfe eines MatLab-Plugins in Imaris hinsichtlich der mittleren Intensitäten und deren Standardabweichungen über die Zeit normalisiert. Dadurch wurden unterschiedliche Bildqualitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten kompensiert. Die Segmentierung wurde mit einem manuellem Schwellenwert von 500 inklusive einer Hintergrundeliminierung (mit Angabe des Durchmessers des größten Objektes in der Zeitserie) und einer Glättung (2x laterale Auflösung) durchgeführt (Abb. 4.4 b). Das Volumen und andere Parameter wurden durch die Software automatisch berechnet. Einzelne Plaques wurden über die Zeit verfolgt, sodass die Kinetiken der Volumina generiert wurden (Abb. 4.4 c, d). Zusätzlich wurde eine Linearisierung durch Berechnung der Radien unter der Annahme einer kugelförmigen Gestalt der amyloiden Plaques durchgeführt. Eine lineare Wachstumsrate wurde durch Berechnung des Anstieges aus einer linearen Regression ermittelt (Abb. 4.4 d). Innerhalb einer Zeitserie von Bildern in dieser Arbeit wurden für jeden Zeitpunkt die gleichen Einstellungen des Kontrastes verwendet. In diesen Zeitserien wurden nur die ausgewerteten Daten dargestellt und alle autofluoreszenten Objekte wurden entfernt, um den Betrachter auf den wesentlichen Bildinhalt zu lenken.

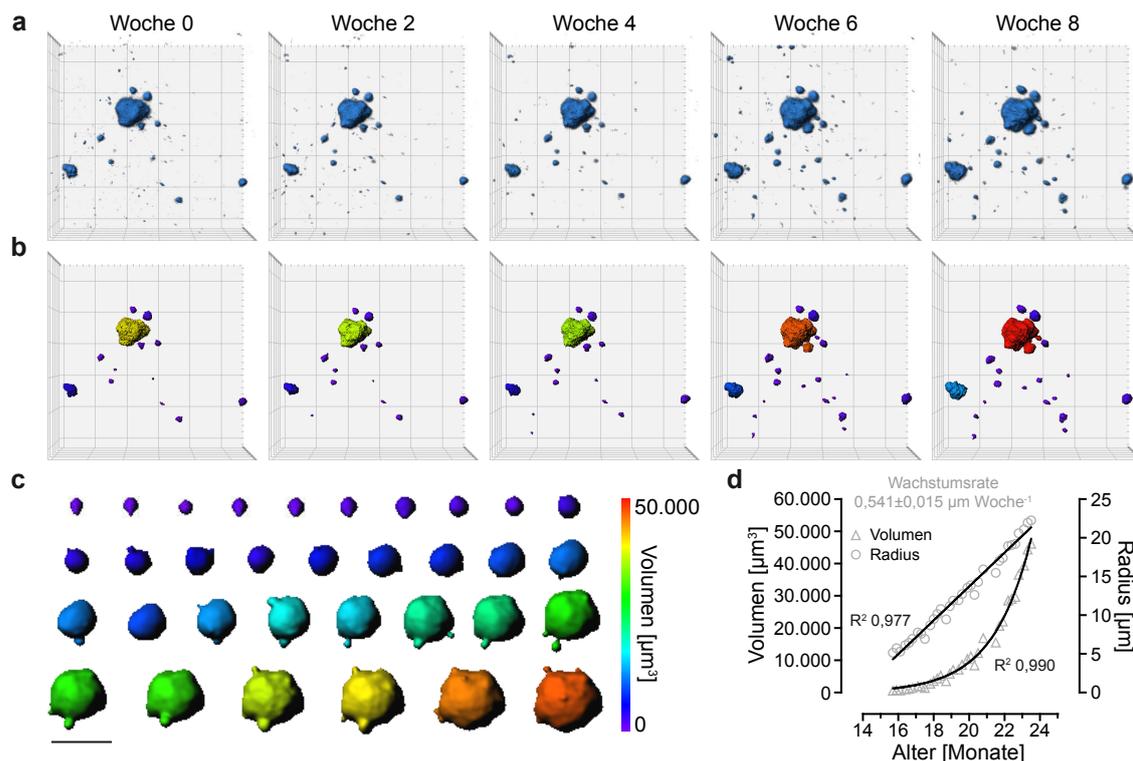


Abb. 4.4: Darstellung der dreidimensionalen Auswertung amyloider Plaques über die Zeit. In **a** wurde eine Zeitserie amyloider Plaques als dreidimensionale Volumen-gereordnete Bilder dargestellt. In den Bildern sind die Fluoreszenz von Methoxy-X04 markierten Plaque und autofluoreszente kleine Objekte zu sehen. Amyloide Plaques konnten aufgrund ihrer zeitlich stabilen Position und für großvolumige Plaques anhand ihrer Größe von autofluoreszenten Objekten unterschieden werden (**a**). Die Rohdaten der Bilder wurden als vierdimensionale Daten mit der Software Imaris (Version 6.2.1 oder 7.4.2) segmentiert. In **b** sind die segmentierten Plaques der Zeitserie aus **a** zu sehen, deren Volumina farblich kodiert dargestellt wurden (Farbskala wie in **c** von 0 bis $80.000 \mu\text{m}^3$). Individuelle Serien von Plaques wurden zeitlich geordnet (**c**). Die Volumina des Beispiel-Plaques von **c** wurden über die Zeit dargestellt und es wurde eine exponentielle Wachstumsfunktion angepasst (**d**). Aus den Volumina der Plaques wurden die Radien unter der Annahme berechnet, das Plaques annähernd kugelförmig sind. Der Anstieg aus der linearen Regression repräsentiert die lineare Wachstumsrate der Plaques (**d**). Die Seitenlängen der Quadrate in den dreidimensionalen Bildern und der Maßstab stellen $50 \mu\text{m}$ dar.

4.4.4 Detektion von Synapsen

Die Detektion von Synapsen wurde in der Software IGOR Pro Version 6.2.3.3 (WaveMetrics) mit einem von Dr. Mario Dorostkar angepassten Algorithmus durchgeführt (Dorostkar u. a., 2010). Die dreidimensionalen Bildstapel mit einer Datentiefe von 12 bit wurden zunächst mittels Dekonvolution („3D Blind Deconvolution“ Algorithmus mit 20 Iterationen, AutoQuantX2) optimiert. Dies führte zu einer starken Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses, wodurch kleine Details (wie Synapsen) in den Bildern besser zu erkennen waren (Abb. 4.5 auf der nächsten Seite). Bei

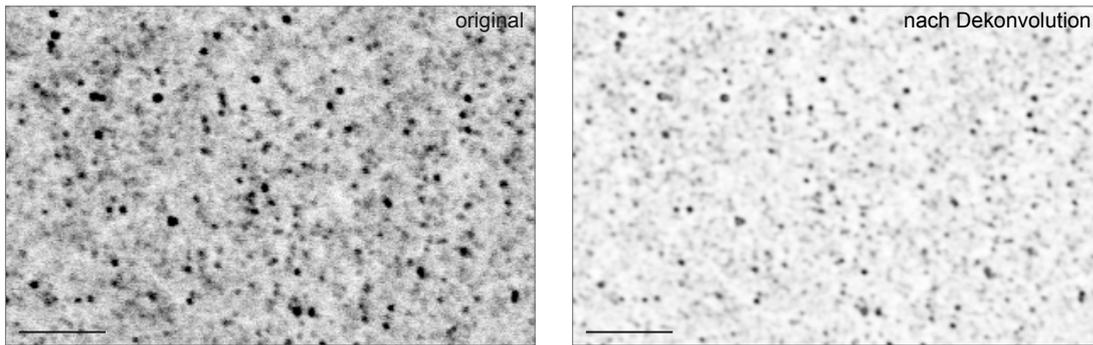


Abb. 4.5: Beispiel zur Bildoptimierung mittels Dekonvolution. Das Originalbild zeigt einen optischen Schnitt einer Fluoreszenzaufnahme (Synapsin-Färbung) mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Es war ein deutliches Bildrauschen zu erkennen. Durch die 3D Dekonvolution mit dem „3D Blind Deconvolution“ Algorithmus der Software AutoQuantX2 wurde das Signal-Rausch-Verhältnis stark verbessert, wodurch Details besser zu erkennen waren. Der Maßstab repräsentiert 5 μm .

diesem Algorithmus werden alle Informationen aus dem Bildvolumen genutzt, um eine berechnete Punktspreizfunktion an die Bilddaten anzupassen. Gleichzeitig wird durch Dekonvolution des dreidimensionalen Bildes mit der Punktspreizfunktion die Bildqualität verbessert (T. J. Holmes u. a., 2006). Die optische Auflösung des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops in Kombination mit einem höchst korrigierten Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,3 war ausreichend zur Auflösung einzelner Synapsen, deren Größen im Bereich von 300 bis 1600 nm liegen (Y. Tang u. a., 2001). Zur Detektion der Synapsen wurden jeweils das mittlere Bild aus dem dreidimensionalen Bildstapel verwendet und der Laplace-Operator nach der folgenden Gleichung angewandt:

$$\nabla^2 I = \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 I}{\partial y^2}$$

Als zweite Ableitung der Fluoreszenzintensität in den beiden Raumkoordinaten führte diese mathematische Operation zur Detektion von Strukturen, die sich in einem relativen Maß vom Hintergrund abhoben (Abb. 4.6 a, b auf der nächsten Seite). Dieses Bild wurde anschließend mit einem Schwellenwert segmentiert, dem der zweifachen Standardabweichung der Bildwerte entsprach (Abb. 4.6 c). Von den detektierten Flächen wurden die Massezentren berechnet und als Koordinaten für die Synapsen gespeichert. Eine Überlagerung der detektierten Synapsen mit dem Originalbild zeigt die sehr gute Erkennungseffizienz des Algorithmus (Abb. 4.6 d). Zusätzlich wurden die freien Flächen von Zellkörpern und Blutgefäßen durch ein-

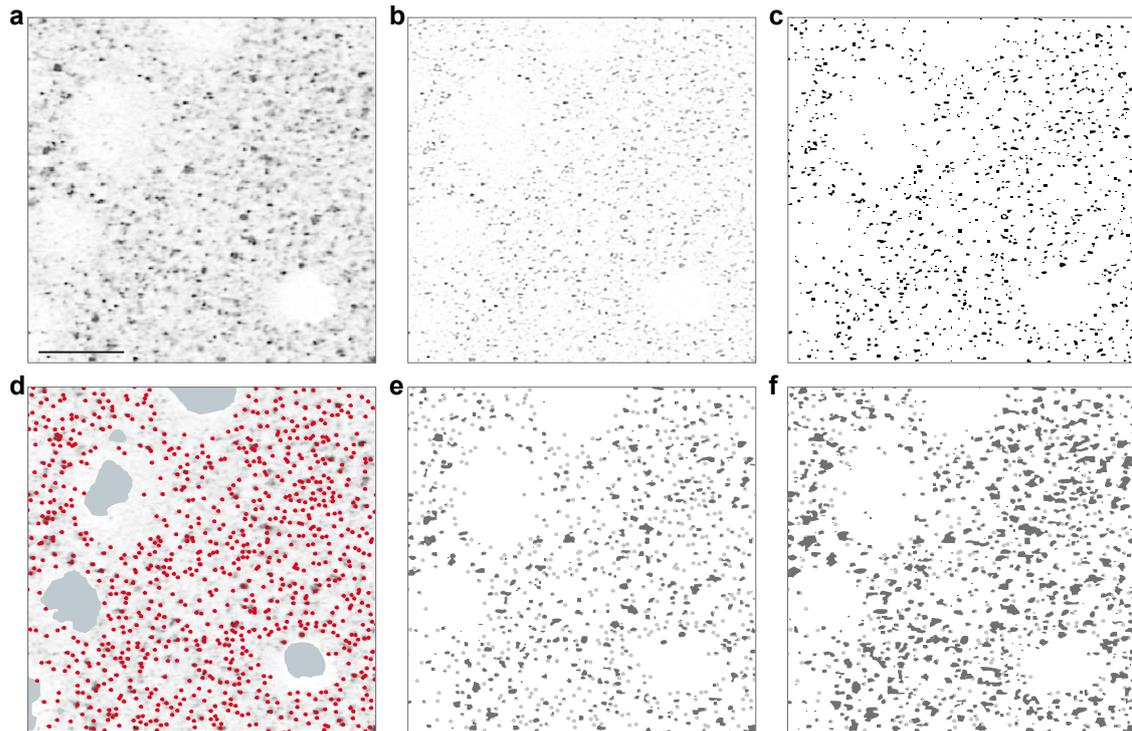


Abb. 4.6: Darstellung der Synapsendetektion mittels Laplace-Operator und Vergleich zur konventionellen Schwellenwertdetektion. Eine charakteristische Fluoreszenzaufnahme (Synapsin) eines optischen Schnittbildes war durch einen großen Dynamikbereich der Intensität gekennzeichnet (**a**). Durch Anwendung des Laplace-Operators auf die Fluoreszenzintensität in den beiden Raumkoordinaten, trat ein kanten-schärfender Effekt ein. Dadurch wurden Strukturen detektiert, die sich in einem relativen Maß vom Hintergrund abhoben (**b**). Auf das generierte Bild wurde anschließend eine Schwellenwertsegmentierung (Schwellenwert $2\times$ Standardabweichung der Bilddaten) zur Detektion der Synapsen angewendet (**c**). In **d** sind die berechneten Massezentren der detektierten Synapsen (rot) als Überlagerung des Originalbildes zu sehen. Zusätzlich wurden durch einfache Schwellenwertdetektion die freien Flächen (grau) der Zellkörper und Blutgefäße ermittelt und bei der Berechnung der Synapsendichte von der Gesamtfläche abgezogen. Ein Vergleich zu einer einfachen Schwellenwertsegmentierung zeigte, dass hier entweder zu wenig Synapsen oder mehrere Synapsen als ein Objekt detektiert wurden (dunkelgraue Flächen, **e**, **f**). Als Schwellenwerte wurden $4\times$ (**e**) oder $2\times$ (**f**) die Standardabweichung der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Pixel im Bild angewandt. Die mit dem Laplace-Operator detektierten Synapsen sind als hellgraue Punkte unterlegt. Der Maßstab repräsentiert $10\ \mu\text{m}$.

fache Schwellenwertsegmentierung (Detektion unterhalb der 10. Perzentile aller Intensitätswerte, alle Flächen $>20\ \mu\text{m}^2$) ermittelt und von der Gesamtfläche bei der Berechnung der Synapsendichte abgezogen (Abb. 4.6 d). Ein Vergleich zur Detektion von Synapsen mittels einfacher Schwellenwertsegmentierung wurde in den Abbildungen 4.6 e und f dargestellt. Aufgrund der breiten Verteilung der Intensitäten verschiedener Synapsen wurden entweder zu wenig Synapsen detektiert (e) oder mehrere Synapsen als eine erkannt (f). Für die Auswertung der Synapsendichte

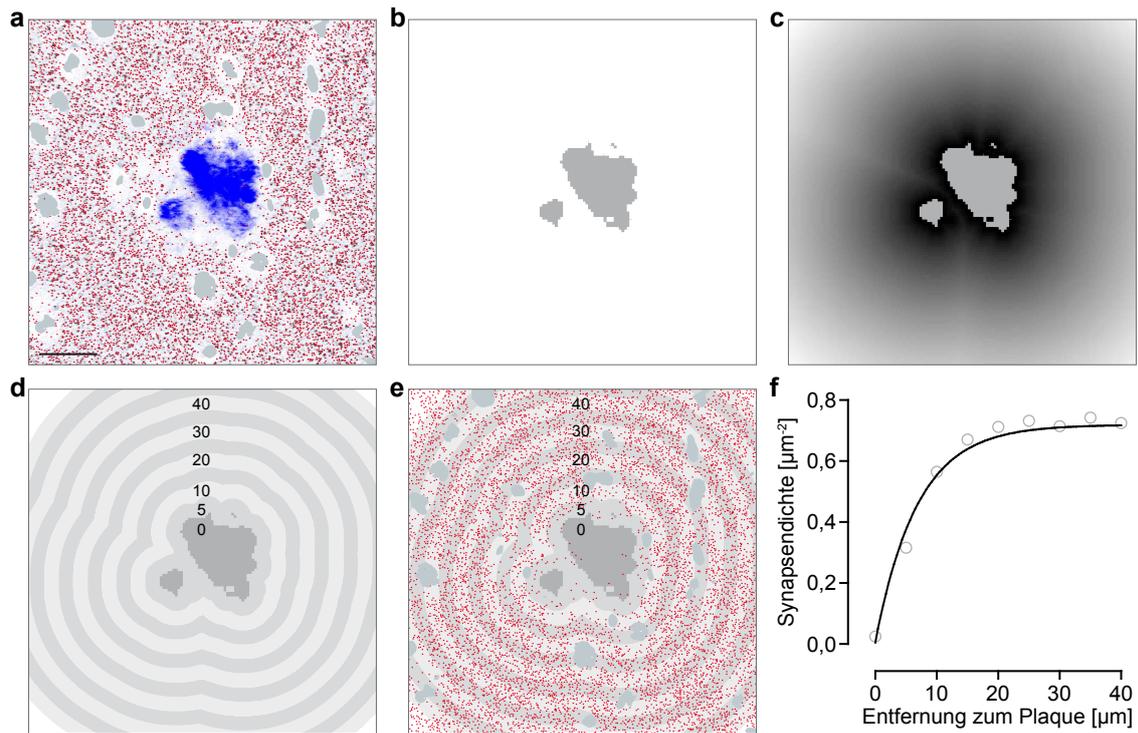


Abb. 4.7: Messung der Synapsendichte in Abhängigkeit zur Entfernung von amyloiden Plaques. Zunächst wurde die Synapsendetektion durchgeführt, wie in der vorherigen Abbildung beschrieben. In **a** sind ein amyloider Plaque (blau), sowie die detektierten Synapsen (rot) und Zell-/Blutgefäßflächen (grau) zu sehen. Die Plaquefläche wurde durch einfache Schwellenwertsegmentierung ermittelt (**b**). Für jeden Pixel im Bild wurde der kürzeste, euklidische Abstand zum Plaquerand berechnet. Die Abstände für jeden Pixel wurden als Grauwerte in **c** dargestellt. Mithilfe dieser Abstandsmatrix wurden Abstandsklassen mit einer Breite von $5\ \mu\text{m}$ eingeteilt (**d**, hell- und dunkelgrau alternierende Ringe mit jeweiligen Entfernungsangaben). Für jede Abstandsklasse wurden Anzahl der Synapsen und Fläche abzüglich der Flächen von Zellen und Blutgefäßen bestimmt. Aus diesen Daten konnte die Synapsendichte in Abhängigkeit von der Entfernung zum amyloiden Plaque dargestellt werden (**f**). Der Maßstab repräsentiert $20\ \mu\text{m}$.

in Abhängigkeit von der Entfernung zu einem amyloiden Plaque wurden zunächst die Synapsen detektiert, wie bereits beschrieben (Abb. 4.7 a auf dieser Seite). Die Plaquefläche wurde durch einfache Schwellenwertsegmentierung (Detektion oberhalb der 96,2. bis 99,2. Perzentile aller Intensitätswerte) nach der Anwendung eines Median-Filters ermittelt. Das Ergebnis wurde für jedes Bild kontrolliert und wenn nötig der Schwellenwert angepasst (Abb. 4.7 b). Für jeden Pixel im Bild wurde der kürzeste euklidische Abstand zum Plaque-Rand berechnet (Abb. 4.7 c). Mithilfe dieser Abstandsmatrix wurden Abstandsklassen mit einer Breite von $5\ \mu\text{m}$ um den Plaque herum eingeteilt (Abb. 4.7 d). Für jede Abstandsklasse wurde die Anzahl der Synapsen und die Fläche ermittelt, womit die Synapsendichte in Abhängigkeit

der Entfernung zum amyloiden Plaque bestimmt werden kann (Abb. 4.7f).

4.4.5 Statistik und Datenauswertung

Die meisten Zusammenstellungen und Berechnungen von Daten wurden in Excel 2003 (Microsoft) durchgeführt. Alle Graphen wurden in Prism (Version 5.04, GraphPad) generiert. Lineare und nichtlineare Regressionen, sowie statistische Berechnungen wurden in Prism ausgeführt. Die Abbildungen und Grafiken wurden in Illustrator (Version CS4, Adobe) arrangiert oder gezeichnet.

Als exponentielle Wachstumsfunktion wurde folgende Gleichung an die Daten angepasst:

$$y = Y_0 e^{kx}$$

wobei Y_0 den Y-Wert bei einer Zeit von Null und k die Wachstumsrate darstellen. Die Anpassung einer exponentiellen einphasigen Assoziationsfunktion wurde mit folgender Gleichung durchgeführt:

$$y = Y_0 + (Plateau - Y_0)(1 - e^{-kx})$$

wobei Y_0 den Y-Wert bei einer Zeit von Null und k die Ratenkonstante darstellen. Das Plateau entspricht dem Grenzwert für $x \rightarrow \infty$ in der gleichen Einheit des Y-Wertes. Die Halbwertsdistanz wurde berechnet als $\ln(2)/k$. Eine Sigmoid-Funktion wurde mit folgender Gleichung angepasst:

$$y = B + \frac{T - B}{1 + 10^{H(M-x)}}$$

wobei B dem Grenzwert für $x \rightarrow -\infty$ und T dem Grenzwert für $x \rightarrow \infty$ in der gleichen Einheit des Y-Wertes entsprechen. H ist der Hill-Anstieg, der die Steilheit der Kurve darstellt, während M dem X-Wert bei der Hälfte zwischen B und T entspricht.

Für die statistische Auswertung wurde zunächst überprüft, ob die Daten normalverteilt sind (D'Agostino-Pearson omnibus K2 Test). Die Plaquedichten und -größen folgten einer logarithmischen Normalverteilung und wurden durch Logarithmierung transformiert. Nach der Transformation konnten einfache, parametrische Tests angewendet werden. Diese Daten wurden in den Graphen mit einer „AntiLog“ Skalierung versehen, um die reale Skalierung der Größen darzustellen. Die linearen Wachstumsraten amyloider Plaques waren nicht normalverteilt. In der Be-

schreibung der Plaquewachstumskinetik wurden die Wachstumsraten mit nicht-parametrischen Tests auf Unterschiede überprüft. Im Therapieversuch wurde für jede Maus aus den jeweils drei mikroskopierten Positionen der Mittelwert für die Wachstumsrate gebildet. Die Werte der Positionen stellten die Mittelwerte aus allen Wachstumsraten der einzelnen Plaques dar. Durch diese Berechnung wurden die Daten normal-verteilt (Zentraler Grenzwertsatz) und parametrische Tests konnten angewandt werden. Vergleiche gegen hypothetische Werte wurden mit dem Einstichproben-t-Test (parametrisch) oder einem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (nicht-parametrisch) durchgeführt. Zwei Mittelwerte wurden mit einem einfachen t-Test oder t-Test für gepaarte Proben (Messwiederholungen, parametrisch) oder Mann-Whitney-Test (nicht-parametrisch) auf Unterschiede überprüft. Für Mehrfachvergleiche wurden die einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Kramer Post-hoc-Test oder Bonferroni's Post-hoc-test für ausgewählte Vergleiche (parametrisch) oder der Kruakl-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test (nicht-parametrisch) angewendet. Auf statistische Unterschiede in Verteilungen (Morphologie dendritischer Spines) wurde mit einem χ^2 -Test geprüft. Die Überprüfung auf Korrelationen zwischen zwei Parametern wurde nach Pearson (parametrisch) oder Spearman (nicht-parametrisch) durchgeführt. Bei linearen Regressionen wurde mit einem F-Test überprüft, ob der Anstieg oder der Achsenabschnitt ungleich Null sind. Es wurden folgende statistische Signifikanzniveaus (wie in Prism) eingeteilt: * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ **** $P < 0,0001$.

4.5 Material und Lösungen

Tabelle 4.4: Material und Lösungen

Material	Details	Firma
Agarose		Serva
BSA (bovine serum albumin)		Sigma
Bromphenolblau		Merck
Deckgläschen (Nr.1½)		Zeiss
Dimethylsulfoxid		Sigma
DNA-Ladepuffer		Sigma
DNA-Standard (1kb-ladder)		New England Biolabs
EDTA		Merck

4. Material und Methoden

Material	Details	Firma
Essigsäure		Roth
Ethanol		VWR
Falcon-Röhrchen	15/50 ml	Greiner bio-one
Flügelkanüle		Hospira venisystems
Immersionsöl	$n = 1,518$	Zeiss
isotone Kochsalzlösung		Braun
Kaliumchlorid		Merck
Kaliumdihydrogenphosphat		Merck
Kanülen	27G/20G	Terumo
Methoxy-Lösung		
	Methoxy-X04 10 mg	
	Dimethylsulfoxid 100 μ l	
	1,2-Propandiol 450 μ l	
	PBS steril 450 μ l	
	Salzsäure bis Lösung klar wurde	
Natriumchlorid		Merck
Natriumhydrogenphosphat		Merck
Natriumhydroxid		Merck
Natriumazid		Roth
Objektträger		ThermoScientific/Menzel
Paraformaldehyd (PFA)		Roth
Pasteurpipetten		Hartenstein
PBS (steril)		Pan Biotech
PBS (10x)		
	Natriumchlorid 1,4 M	
	Kaliumchlorid 27 mM	
	Natriumhydrogenphosphat 10 mM	
	Kaliumdihydrogenphosphat 18 mM	
Pipettenspitzen	2 μ l	VWR
	10 μ l	
	200 μ l	
	1000 μ l	
1,2-Propandiol		Sigma

Material	Details	Firma
Rasierklingen		Rotbart
Reaktionsgefäße		Eppendorf
Salzsäure		Roth
Skalpelle		Swann Morton
Spritzen		Terumo
Sterilfilter für Spritzen	0,2 µm/ 0,45 µm	Whatman/ Schleicher&Schüll
Sybr-Gold		Life Technologies
TAE-Puffer (50 x)	Tris 2 M EDTA 64 mM Essigsäure 6 %	
Texas Red®-Dextran	MW 70 kD	Invitrogen
Tris		Roth
Triton X-100		Sigma

Literatur

- Abbott, A. (Juli 2011). “Dementia: a problem for our age.” In: *Nature* 475.7355, S2–S4.
- Abramov, E., I. Dolev, H. Fogel, G. D. Ciccotosto, E. Ruff und I. Slutsky (Dez. 2009). “Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses.” In: *Nat Neurosci* 12.12, S. 1567–1576.
- Adlard, P. A., L. Bica, A. R. White u. a. (2011). “Metal ionophore treatment restores dendritic spine density and synaptic protein levels in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *PLoS One* 6.3, e17669.
- Allinson, T. M. J., E. T. Parkin, A. J. Turner und N. M. Hooper (Nov. 2003). “ADAMs family members as amyloid precursor protein α -secretases.” In: *J Neurosci Res* 74.3, S. 342–352.
- Almeida, C. G., D. Tampellini, R. H. Takahashi u. a. (Nov. 2005). “ β -amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses.” In: *Neurobiol Dis* 20.2, S. 187–198.
- Alpár, A., U. Ueberham, M. K. Brückner, T. Arendt und U. Gärtner (2006). “The expression of wild-type human amyloid precursor protein affects the dendritic phenotype of neocortical pyramidal neurons in transgenic mice.” In: *Int J Dev Neurosci* 24.2-3, S. 133–140.
- Altman, J. und G. D. Das (Dez. 1964). “Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain.” In: *Nature* 204, S. 1161–1163.
- Alvarez, V. A. und B. L. Sabatini (2007). “Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines.” In: *Annu Rev Neurosci* 30, S. 79–97.
- Alzheimer, A. (1907). “Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.” In: *Allg Zeitschr Psychiatr* 64, S. 146–148.
- Apelt, J., M. Bigl, P. Wunderlich und R. Schliebs (Nov. 2004). “Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of β -secretase activity and β -amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology.” In: *Int J Dev Neurosci* 22.7, S. 475–484.

- Arbel-Ornath, M., M. Garcia-Alloza, K. V. Kuchibhotla, T. Spires-Jones und B. J. Bacskai (2011). *Imaging in Neuroscience: A Laboratory Manual*. Hrsg. von F. Helmchen und A. Konnerth. Cold Spring Harbor Laboratory Press, S. 989–997.
- Arendt, T. (Juli 2009). “Synaptic degeneration in Alzheimer’s disease.” In: *Acta Neuropathol* 118.1, S. 167–179.
- Armstrong, R. A., D. Myers und C. U. Smith (Juni 1991). “Alzheimer’s disease: size class frequency distribution of senile plaques: do they indicate when a brain tissue was affected?” In: *Neurosci Lett* 127.2, S. 223–226.
- Bacskai, B. J., M. P. Frosch, S. H. Freeman u. a. (März 2007). “Molecular imaging with Pittsburgh Compound B confirmed at autopsy: a case report.” In: *Arch Neurol* 64.3, S. 431–434.
- Bacskai, B. J., G. A. Hickey, J. Skoch u. a. (Okt. 2003). “Four-dimensional multi-photon imaging of brain entry, amyloid binding, and clearance of an amyloid- β ligand in transgenic mice.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.21, S. 12462–12467.
- Bacskai, B. J., S. T. Kajdasz, R. H. Christie u. a. (März 2001). “Imaging of amyloid- β deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy.” In: *Nat Med* 7.3, S. 369–372.
- Bacskai, B. J., S. T. Kajdasz, M. E. McLellan u. a. (Sep. 2002). “Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid- β in vivo by immunotherapy.” In: *J Neurosci* 22.18, S. 7873–7878.
- Bard, F., R. Barbour, C. Cannon u. a. (Feb. 2003). “Epitope and isotype specificities of antibodies to β -amyloid peptide for protection against Alzheimer’s disease-like neuropathology.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.4, S. 2023–2028.
- Bard, F., C. Cannon, R. Barbour u. a. (Aug. 2000). “Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease.” In: *Nat Med* 6.8, S. 916–919.
- Barghorn, S., V. Nimmrich, A. Striebinger u. a. (Nov. 2005). “Globular amyloid β -peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer’s disease.” In: *J Neurochem* 95.3, S. 834–847.
- Bateman, R. J., L. Y. Munsell, J. C. Morris, R. Swarm, K. E. Yarasheski und D. M. Holtzman (Juli 2006). “Human amyloid- β synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo.” In: *Nat Med* 12.7, S. 856–861.
- Bateman, R. J., C. Xiong, T. L. S. Benzinger u. a. (Aug. 2012). “Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer’s disease.” In: *N Engl J Med* 367.9, S. 795–804.

- Batsch, N. L. und M. S. Mittelman (2012). *World Alzheimer report 2012*. Techn. Ber. Alzheimer's Disease International.
- Beach, T. G., R. Walker und E. G. McGeer (1989). "Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum." In: *Glia* 2.6, S. 420–436.
- Bero, A. W., A. Q. Bauer, F. R. Stewart u. a. (März 2012). "Bidirectional relationship between functional connectivity and amyloid- β deposition in mouse brain." In: *J Neurosci* 32.13, S. 4334–4340.
- Bero, A. W., P. Yan, J. H. Roh u. a. (Juni 2011). "Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid- β deposition." In: *Nat Neurosci* 14.6, S. 750–756.
- Bertram, L., C. M. Lill und R. E. Tanzi (Okt. 2010). "The genetics of Alzheimer disease: back to the future." In: *Neuron* 68.2, S. 270–281.
- Bhatt, D. H., S. Zhang und W.-B. Gan (2009). "Dendritic spine dynamics." In: *Annu Rev Physiol* 71, S. 261–282.
- Bitan, G., M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek und D. B. Teplow (Jan. 2003). "Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.1, S. 330–335.
- Bittner, T., S. Burgold, M. M. Dorostkar u. a. (Dez. 2012). "Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss." In: *Acta Neuropathol* 124.6, S. 797–807.
- Bittner, T., M. Fuhrmann, S. Burgold u. a. (Aug. 2009). " γ -secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway." In: *J Neurosci* 29.33, S. 10405–10409.
- Bittner, T., M. Fuhrmann, S. Burgold u. a. (2010). "Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice." In: *PLoS One* 5.11, e15477.
- Bliss, T. V. und G. L. Collingridge (Jan. 1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." In: *Nature* 361.6407, S. 31–39.
- Bliss, T. V. und A. R. Gardner-Medwin (Juli 1973a). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." In: *J Physiol* 232.2, S. 357–374.
- Bliss, T. V. und T. Lømo (Juli 1973b). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." In: *J Physiol* 232.2, S. 331–356.

- Boche, D., V. H. Perry und J. A. Nicoll (Feb. 2013). "Activation patterns of microglia and their identification in the human brain." In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 39.1, S. 3–18.
- Boncristiano, S., M. E. Calhoun, V. Howard u. a. (Mai 2005). "Neocortical synaptic bouton number is maintained despite robust amyloid deposition in APP23 transgenic mice." In: *Neurobiol Aging* 26.5, S. 607–613.
- Bourne, J. und K. M. Harris (Juni 2007). "Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?" In: *Curr Opin Neurobiol* 17.3, S. 381–386.
- Braak, H. und E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." In: *Acta Neuropathol* 82.4, S. 239–259.
- (1997). "Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories." In: *Neurobiol Aging* 18.4, S. 351–357.
- Braakman, N., J. Matysik, S. G. van Duinen u. a. (Sep. 2006). "Longitudinal assessment of Alzheimer's β -amyloid plaque development in transgenic mice monitored by in vivo magnetic resonance microimaging." In: *J Magn Reson Imaging* 24.3, S. 530–536.
- Bragina, L., C. Candiracci, P. Barbaresi, S. Giovedì, F. Benfenati und F. Conti (Juni 2007). "Heterogeneity of glutamatergic and GABAergic release machinery in cerebral cortex." In: *Neuroscience* 146.4, S. 1829–1840.
- Brody, D. L. und D. M. Holtzman (2008). "Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders." In: *Annu Rev Neurosci* 31, S. 175–193.
- Burgold, S., T. Bittner, M. M. Dorostkar u. a. (März 2011). "In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks." In: *Acta Neuropathol* 121.3, S. 327–335.
- Busch, C., J. Bohl und T. G. Ohm (1997). "Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus." In: *Neurobiol Aging* 18.4, S. 401–406.
- Buttini, M., E. Masliah, R. Barbour u. a. (Okt. 2005). " β -amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease." In: *J Neurosci* 25.40, S. 9096–9101.
- Callaway, E. (Sep. 2012). "Alzheimer's drugs take a new tack." In: *Nature* 489.7414, S. 13–14.
- Calon, F., G. P. Lim, F. Yang u. a. (Sep. 2004). "Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model." In: *Neuron* 43.5, S. 633–645.

- Campion, D., C. Dumanchin, D. Hannequin u. a. (Sep. 1999). “Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum.” In: *Am J Hum Genet* 65.3, S. 664–670.
- Caroni, P., F. Donato und D. Muller (Juli 2012). “Structural plasticity upon learning: regulation and functions.” In: *Nat Rev Neurosci* 13.7, S. 478–490.
- Carrasquillo, M. M., F. Zou, V. S. Pankratz u. a. (Feb. 2009). “Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer’s disease.” In: *Nat Genet* 41.2, S. 192–198.
- Chen, G., K. S. Chen, D. Kobayashi u. a. (März 2007). “Active β -amyloid immunization restores spatial learning in PDAPP mice displaying very low levels of β -amyloid.” In: *J Neurosci* 27.10, S. 2654–2662.
- Chiti, F. und C. M. Dobson (2006). “Protein misfolding, functional amyloid, and human disease.” In: *Annu Rev Biochem* 75, S. 333–366.
- Chiti, F., M. Stefani, N. Taddei, G. Ramponi und C. M. Dobson (Aug. 2003). “Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates.” In: *Nature* 424.6950, S. 805–808.
- Chiti, F., N. Taddei, M. Bucciantini, P. White, G. Ramponi und C. M. Dobson (Apr. 2000). “Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein.” In: *EMBO J* 19.7, S. 1441–1449.
- Chiti, F., N. Taddei, F. Baroni u. a. (Feb. 2002). “Kinetic partitioning of protein folding and aggregation.” In: *Nat Struct Biol* 9.2, S. 137–143.
- Christie, R. H., B. J. Bacskai, W. R. Zipfel u. a. (Feb. 2001). “Growth arrest of individual senile plaques in a model of Alzheimer’s disease observed by in vivo multiphoton microscopy.” In: *J Neurosci* 21.3, S. 858–864.
- Cirrito, J. R., P. C. May, M. A. O’Dell u. a. (Okt. 2003). “In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid- β metabolism and half-life.” In: *J Neurosci* 23.26, S. 8844–8853.
- Citron, M. (Mai 2010). “Alzheimer’s disease: strategies for disease modification.” In: *Nat Rev Drug Discov* 9.5, S. 387–398.
- Cohen, A. D., M. D. Ikonovic, E. E. Abrahamson u. a. (Sep. 2009). “Anti-amyloid effects of small molecule A β -binding agents in PS1/APP mice.” In: *Lett Drug Des Discov* 6.6, S. 437–444.
- Condello, C., A. Schain und J. Grutzendler (2011). “Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition.” In: *Sci Rep* 1, srep00019.

- Cooke, S. F. und T. V. P. Bliss (Juli 2006). "Plasticity in the human central nervous system." In: *Brain* 129.Pt 7, S. 1659–1673.
- Couch, B. A., M. E. Kerrisk, A. C. Kaufman, H. B. Nygaard, S. M. Strittmatter und A. J. Koleske (Apr. 2013). "Delayed amyloid plaque deposition and behavioral deficits in outcrossed A β PP/PS1 mice." In: *J Comp Neurol* 521.6, S. 1395–1408.
- Coyle, J. T., D. L. Price und M. R. DeLong (März 1983). "Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation." In: *Science* 219.4589, S. 1184–1190.
- Cruz, L., B. Urbanc, S. V. Buldyrev u. a. (Juli 1997). "Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94.14, S. 7612–7616.
- Cummings, J. L., H. V. Vinters, G. M. Cole und Z. S. Khachaturian (Juli 1998). "Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities." In: *Neurology* 51.1 Suppl 1, S2–17.
- Dailey, M. E. und S. J. Smith (Mai 1996). "The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices." In: *J Neurosci* 16.9, S. 2983–2994.
- D'Amelio, M., V. Cavallucci, S. Middei u. a. (Jan. 2011). "Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease." In: *Nat Neurosci* 14.1, S. 69–76.
- Das, P., V. Howard, N. Loosbrock, D. Dickson, M. P. Murphy und T. E. Golde (Sep. 2003). "Amyloid- β immunization effectively reduces amyloid deposition in FcR γ -/- knock-out mice." In: *J Neurosci* 23.24, S. 8532–8538.
- Das, P., M. P. Murphy, L. H. Younkin, S. G. Younkin und T. E. Golde (2001). "Reduced effectiveness of A β ₁₋₄₂ immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition." In: *Neurobiol Aging* 22.5, S. 721–727.
- Das, P., C. Verbeeck, L. Minter u. a. (Aug. 2012). "Transient pharmacologic lowering of A β production prior to deposition results in sustained reduction of amyloid plaque pathology." In: *Mol Neurodegener* 7.39, S. 1–9.
- Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang u. a. (Juni 2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." In: *Nat Neurosci* 8.6, S. 752–758.
- Davies, P. und A. J. Maloney (Dez. 1976). "Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease." In: *Lancet* 2.8000, S. 1403.
- De Strooper, B. (Apr. 2003). "Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex." In: *Neuron* 38.1, S. 9–12.
- (Apr. 2010). "Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process." In: *Physiol Rev* 90.2, S. 465–494.

- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts u. a. (Jan. 1998). “Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein.” In: *Nature* 391.6665, S. 387–390.
- De Strooper, B. und T. Voet (Aug. 2012). “Alzheimer’s disease: a protective mutation.” In: *Nature* 488.7409, S. 38–39.
- Deacon, R. M. J., C. L. Thomas, J. N. P. Rawlins und B. J. Morley (Mai 2007). “A comparison of the behavior of C57BL/6 and C57BL/10 mice.” In: *Behav Brain Res* 179.2, S. 239–247.
- Dehmelt, L. und S. Halpain (2005). “The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins.” In: *Genome Biol* 6.1, S. 204.
- DeKosky, S. T. und S. W. Scheff (Mai 1990). “Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer’s disease: correlation with cognitive severity.” In: *Ann Neurol* 27.5, S. 457–464.
- Delaère, P., C. Duyckaerts, Y. He, F. Piette und J. J. Hauw (1991). “Subtypes and differential laminar distributions of β A4 deposits in Alzheimer’s disease: relationship with the intellectual status of 26 cases.” In: *Acta Neuropathol* 81.3, S. 328–335.
- Delrieu, J., P. J. Ousset, C. Caillaud und B. Vellas (Jan. 2012). “Clinical trials in Alzheimer’s disease: immunotherapy approaches.” In: *J Neurochem* 120 Suppl 1, S. 186–193.
- DeMattos, R. B., K. R. Bales, D. J. Cummins, J. C. Dodart, S. M. Paul und D. M. Holtzman (Juli 2001). “Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.15, S. 8850–8855.
- DeMattos, R. B., K. R. Bales, D. J. Cummins, S. M. Paul und D. M. Holtzman (März 2002a). “Brain to plasma amyloid- β efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *Science* 295.5563, S. 2264–2267.
- DeMattos, R. B., K. R. Bales, M. Parsadanian u. a. (Apr. 2002b). “Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid- β (A β) equilibrium in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *J Neurochem* 81.2, S. 229–236.
- DeMattos, R. B., J. Lu, Y. Tang u. a. (Dez. 2012). “A plaque-specific antibody clears existing β -amyloid plaques in Alzheimer’s disease mice.” In: *Neuron* 76.5, S. 908–920.

- Denk, W., J. H. Strickler und W. W. Webb (Apr. 1990). "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy." In: *Science* 248.4951, S. 73–76.
- Denk, W. und K. Svoboda (März 1997). "Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick." In: *Neuron* 18.3, S. 351–357.
- Diamond, M. C., D. Krech und M. R. Rosenzweig (Aug. 1964). "The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex." In: *J Comp Neurol* 123, S. 111–120.
- Diamond, M. C., F. Law, H. Rhodes u. a. (Sep. 1966). "Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment." In: *J Comp Neurol* 128.1, S. 117–126.
- Dickson, D. W. (Apr. 1997). "The pathogenesis of senile plaques." In: *J Neuropathol Exp Neurol* 56.4, S. 321–339.
- Dodart, J.-C., K. R. Bales, K. S. Gannon u. a. (Mai 2002). "Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model." In: *Nat Neurosci* 5.5, S. 452–457.
- Dong, H., M. V. Martin, S. Chambers und J. G. Csernansky (Jan. 2007). "Spatial relationship between synapse loss and β -amyloid deposition in Tg2576 mice." In: *J Comp Neurol* 500.2, S. 311–321.
- Dong, H., C. M. Yuede, C. A. Coughlan, K. M. Murphy und J. G. Csernansky (Dez. 2009). "Effects of donepezil on amyloid- β and synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." In: *Brain Res* 1303, S. 169–178.
- Dong, H., C. M. Yuede, C. Coughlan, B. Lewis und J. G. Csernansky (Apr. 2008). "Effects of memantine on neuronal structure and conditioned fear in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." In: *Neuropsychopharmacology* 33, S. 3226–3236.
- Dorostkar, M. M., E. Dreosti, B. Odermatt und L. Lagnado (Apr. 2010). "Computational processing of optical measurements of neuronal and synaptic activity in networks." In: *J Neurosci Methods* 188.1, S. 141–150.
- Drewes, G., A. Ebner und E. M. Mandelkow (Aug. 1998). "MAPs, MARKs and microtubule dynamics." In: *Trends Biochem Sci* 23.8, S. 307–311.
- DuBay, K. F., A. P. Pawar, F. Chiti, J. Zurdo, C. M. Dobson und M. Vendruscolo (Aug. 2004). "Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains." In: *J Mol Biol* 341.5, S. 1317–1326.
- Duyckaerts, C., B. Delatour und M.-C. Potier (Juli 2009). "Classification and basic pathology of Alzheimer disease." In: *Acta Neuropathol* 118.1, S. 5–36.

- Duyckaerts, C. und J. J. Hauw (1997). "Diagnosis and staging of Alzheimer disease." In: *Neurobiol Aging* 18.4 Suppl, S33–S42.
- Duyckaerts, C., M.-C. Potier und B. Delatour (Jan. 2008). "Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences." In: *Acta Neuropathol* 115.1, S. 5–38.
- Eisenberg, D. und M. Jucker (März 2012). "The amyloid state of proteins in human diseases." In: *Cell* 148.6, S. 1188–1203.
- el Hachimi, K. H. und J. F. Foncin (1990). "Loss of dendritic spines in Alzheimer's disease." In: *C R Acad Sci III* 311.11, S. 397–402.
- El Khoury, J., S. E. Hickman, C. A. Thomas, L. Cao, S. C. Silverstein und J. D. Loike (Aug. 1996). "Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils." In: *Nature* 382.6593, S. 716–719.
- El Khoury, J., M. Toft, S. E. Hickman u. a. (Apr. 2007). "Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease." In: *Nat Med* 13.4, S. 432–438.
- Engert, F. und T. Bonhoeffer (Mai 1999). "Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity." In: *Nature* 399.6731, S. 66–70.
- Engler, H., A. Forsberg, O. Almkvist u. a. (Nov. 2006). "Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease." In: *Brain* 129.Pt 11, S. 2856–2866.
- Esch, F. S., P. S. Keim, E. C. Beattie u. a. (Juni 1990). "Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor." In: *Science* 248.4959, S. 1122–1124.
- Esler, W. P., E. R. Stimson, J. R. Ghilardi u. a. (Jan. 1996). "In vitro growth of Alzheimer's disease β -amyloid plaques displays first-order kinetics." In: *Biochemistry* 35.3, S. 749–757.
- Fändrich, M. (Aug. 2007). "On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates." In: *Cell Mol Life Sci* 64.16, S. 2066–2078.
- Fändrich, M., M. Schmidt und N. Grigorieff (Juni 2011). "Recent progress in understanding Alzheimer's β -amyloid structures." In: *Trends Biochem Sci* 36.6, S. 338–345.
- Feng, G., R. H. Mellor, M. Bernstein u. a. (Okt. 2000). "Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP." In: *Neuron* 28.1, S. 41–51.

- Fernandez-Escamilla, A.-M., F. Rousseau, J. Schymkowitz und L. Serrano (Okt. 2004). "Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins." In: *Nat Biotechnol* 22.10, S. 1302–1306.
- Ferrer, I. und F. Gullotta (1990). "Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus." In: *Acta Neuropathol* 79.6, S. 680–685.
- Ferri, C. P., M. Prince, C. Brayne u. a. (Dez. 2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study." In: *Lancet* 366.9503, S. 2112–2117.
- Fiala, J. C. und K. M. Harris (2001). "Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes." In: *J Am Med Inform Assoc* 8.1, S. 1–16.
- Fiala, J. C., J. Spacek und K. M. Harris (Juni 2002). "Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?" In: *Brain Res Brain Res Rev* 39.1, S. 29–54.
- Findeis, M. A. (Apr. 2002). "Peptide inhibitors of β amyloid aggregation." In: *Curr Top Med Chem* 2.4, S. 417–423.
- Finder, V. H. und R. Glockshuber (2007). "Amyloid- β aggregation." In: *Neurodegener Dis* 4.1, S. 13–27.
- Frenkel, D., O. Katz und B. Solomon (Okt. 2000). "Immunization against Alzheimer's β -amyloid plaques via EFRH phage administration." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.21, S. 11455–11459.
- Fu, M., X. Yu, J. Lu und Y. Zuo (März 2012). "Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo." In: *Nature* 483.7387, S. 92–95.
- Fu, M. und Y. Zuo (Apr. 2011). "Experience-dependent structural plasticity in the cortex." In: *Trends Neurosci* 34.4, S. 177–187.
- Fuhrmann, M., G. Mitteregger, H. Kretschmar und J. Herms (Juni 2007). "Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine." In: *J Neurosci* 27.23, S. 6224–6233.
- Fujita, A. und Y. Kurachi (März 2000). "SAP family proteins." In: *Biochem Biophys Res Commun* 269.1, S. 1–6.
- Gakhar-Koppole, N., P. Hundeshagen, C. Mandl u. a. (Sep. 2008). "Activity requires soluble amyloid precursor protein α to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway." In: *Eur J Neurosci* 28.5, S. 871–882.

- Garaschuk, O., R.-I. Milos und A. Konnerth (2006). "Targeted bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo." In: *Nat Protoc* 1.1, S. 380–386.
- Garber, K. (Aug. 2012). "Genentech's Alzheimer's antibody trial to study disease prevention." In: *Nat Biotechnol* 30.8, S. 731–732.
- Garcia-Alloza, M., L. A. Borrelli, A. Rozkalne, B. T. Hyman und B. J. Bacskai (Aug. 2007a). "Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model." In: *J Neurochem* 102.4, S. 1095–1104.
- Garcia-Alloza, M., B. J. Ferrara, S. A. Dodwell, G. A. Hickey, B. T. Hyman und B. J. Bacskai (Dez. 2007b). "A limited role for microglia in antibody mediated plaque clearance in APP mice." In: *Neurobiol Dis* 28.3, S. 286–292.
- Garcia-Alloza, M., E. M. Robbins, S. X. Zhang-Nunes u. a. (Dez. 2006). "Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease." In: *Neurobiol Dis* 24.3, S. 516–524.
- Garcia-Alloza, M., M. Subramanian, D. Thyssen u. a. (2009). "Existing plaques and neuritic abnormalities in APP:PS1 mice are not affected by administration of the γ -secretase inhibitor LY-411575." In: *Mol Neurodegener* 4, S. 19.
- Gatz, M., C. A. Reynolds, L. Fratiglioni u. a. (Feb. 2006). "Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease." In: *Arch Gen Psychiatry* 63.2, S. 168–174.
- Gauthier, S., L. Wu, P. Rosa-Neto und J. Jia (2012). "Prevention strategies for Alzheimer's disease." In: *Transl Neurodegener* 1.1, S. 13.
- Gellermann, G. P., H. Byrnes, A. Striebinger u. a. (Mai 2008). "A β -globulomers are formed independently of the fibril pathway." In: *Neurobiol Dis* 30.2, S. 212–220.
- Gentleman, S. M. (Feb. 2013). "Review: Microglia in protein aggregation disorders: friend or foe?" In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 39.1, S. 45–50.
- Ghosh, S., M. D. Wu, S. S. Shaftel u. a. (März 2013). "Sustained interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model." In: *J Neurosci* 33.11, S. 5053–5064.
- Gilman, S., M. Koller, R. S. Black u. a. (Mai 2005). "Clinical effects of A β immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial." In: *Neurology* 64.9, S. 1553–1562.

- Glenner, G. G. und C. W. Wong (Aug. 1984a). “Alzheimer’s disease and Down’s syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein.” In: *Biochem Biophys Res Commun* 122.3, S. 1131–1135.
- (Mai 1984b). “Alzheimer’s disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.” In: *Biochem Biophys Res Commun* 120.3, S. 885–890.
- Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan u. a. (Feb. 1991). “Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer’s disease.” In: *Nature* 349.6311, S. 704–706.
- Goedert, M., B. Ghetti und M. G. Spillantini (Feb. 2012). “Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease.” In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.2, a006254.
- Goldgaber, D., M. I. Lerman, O. W. McBride, U. Saffiotti und D. C. Gajdusek (Feb. 1987). “Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer’s disease.” In: *Science* 235.4791, S. 877–880.
- Gómez-Isla, T., J. L. Price, D. McKeel, Jr, J. C. Morris, J. H. Growdon und B. T. Hyman (Juli 1996). “Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer’s disease.” In: *J Neurosci* 16.14, S. 4491–4500.
- Gong, Y., L. Chang, K. L. Viola u. a. (Sep. 2003). “Alzheimer’s disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.18, S. 10417–10422.
- Göppert-Mayer, M. (1931). “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen.” In: *Annalen der Physik* 401.3, S. 273–294.
- Gouras, G. K., C. G. Almeida und R. H. Takahashi (Okt. 2005). “Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer’s disease.” In: *Neurobiol Aging* 26.9, S. 1235–1244.
- Graeber, M. B. und P. Mehraein (1999). “Reanalysis of the first case of Alzheimer’s disease.” In: *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3, S. 10–13.
- Grathwohl, S. A., R. E. Kälin, T. Bolmont u. a. (Nov. 2009). “Formation and maintenance of Alzheimer’s disease β -amyloid plaques in the absence of microglia.” In: *Nat Neurosci* 12.11, S. 1361–1363.
- Grimmer, T., S. Tholen, B. H. Yousefi u. a. (Nov. 2010). “Progression of cerebral amyloid load is associated with the apolipoprotein E ϵ 4 genotype in Alzheimer’s disease.” In: *Biol Psychiatry* 68.10, S. 879–884.

- Grutzendler, J., K. Helmin, J. Tsai und W.-B. Gan (Feb. 2007). "Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease." In: *Ann N Y Acad Sci* 1097, S. 30–39.
- Grutzendler, J., N. Kasthuri und W.-B. Gan (2002). "Long-term dendritic spine stability in the adult cortex." In: *Nature* 420.6917, S. 812–816.
- Gundelfinger, E. D. und S. tom Dieck (Dez. 2000). "Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain." In: *Naturwissenschaften* 87.12, S. 513–523.
- Gundersen, H. J., P. Bagger, T. F. Bendtsen u. a. (Okt. 1988). "The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis." In: *APMIS* 96.10, S. 857–881.
- Haass, C. (Feb. 2004). "Take five—BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation." In: *EMBO J* 23.3, S. 483–488.
- (Nov. 2010). "Initiation and propagation of neurodegeneration." In: *Nat Med* 16.11, S. 1201–1204.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran und S. Sisodia (Mai 2012). "Trafficking and proteolytic processing of APP." In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.5, a006270.
- Haass, C., C. A. Lemere, A. Capell u. a. (Dez. 1995). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway." In: *Nat Med* 1.12, S. 1291–1296.
- Haass, C., M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung u. a. (Sep. 1992). "Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." In: *Nature* 359.6393, S. 322–325.
- Haass, C. und D. J. Selkoe (Dez. 1993). "Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide." In: *Cell* 75.6, S. 1039–1042.
- (Feb. 2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide." In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8.2, S. 101–112.
- Hampel, H., R. Frank, K. Broich u. a. (Juli 2010). "Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives." In: *Nat Rev Drug Discov* 9.7, S. 560–574.
- Hardy, J. A. und D. Allsop (Okt. 1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." In: *Trends Pharmacol Sci* 12.10, S. 383–388.
- Hardy, J. A. und G. A. Higgins (Apr. 1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." In: *Science* 256.5054, S. 184–185.

- Hardy, J. A. und D. J. Selkoe (Juli 2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." In: *Science* 297.5580, S. 353–356.
- Harper, J. D. und P. T. Lansbury (1997). "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins." In: *Annu Rev Biochem* 66, S. 385–407.
- Harris, K. M., F. E. Jensen und B. Tsao (Juli 1992). "Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation." In: *J Neurosci* 12.7, S. 2685–2705.
- Harris, K. M. und S. B. Kater (1994). "Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function." In: *Annu Rev Neurosci* 17, S. 341–371.
- Harris, K. M. und R. J. Weinberg (Mai 2012). "Ultrastructure of synapses in the mammalian brain." In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.5, a005587.
- Hartman, R. E., Y. Izumi, K. R. Bales, S. M. Paul, D. F. Wozniak und D. M. Holtzman (Juni 2005). "Treatment with an amyloid- β antibody ameliorates plaque load, learning deficits, and hippocampal long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease." In: *J Neurosci* 25.26, S. 6213–6220.
- Hefendehl, J. K., B. M. Wegenast-Braun, C. Liebig u. a. (Jan. 2011). "Long-term in vivo imaging of β -amyloid plaque appearance and growth in a mouse model of cerebral β -amyloidosis." In: *J Neurosci* 31.2, S. 624–629.
- Heinonen, O., H. Soininen, H. Sorvari u. a. (Jan. 1995). "Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease." In: *Neuroscience* 64.2, S. 375–384.
- Helmchen, F. und W. Denk (Dez. 2005). "Deep tissue two-photon microscopy." In: *Nat Methods* 2.12, S. 932–940.
- Hering, H. und M. Sheng (Dez. 2001). "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation." In: *Nat Rev Neurosci* 2.12, S. 880–888.
- Hermes, J., B. Anliker, S. Heber u. a. (Okt. 2004). "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members." In: *EMBO J* 23.20, S. 4106–4115.

- Hibbard, L. S., T. L. Arnica-Sulze, D. McKeel Jr und L. D. Burrell (Juni 1994). “Computed detection and quantitative morphometry of Alzheimer senile plaques.” In: *J Neurosci Methods* 52.2, S. 175–189.
- Hill, T. C. und K. Zito (Jan. 2013). “LTP-induced long-term stabilization of individual nascent dendritic spines.” In: *J Neurosci* 33.2, S. 678–686.
- Hillen, H., S. Barghorn, A. Striebinger u. a. (Aug. 2010). “Generation and therapeutic efficacy of highly oligomer-specific β -amyloid antibodies.” In: *J Neurosci* 30.31, S. 10369–10379.
- Ho, V. M., J.-A. Lee und K. C. Martin (Nov. 2011). “The cell biology of synaptic plasticity.” In: *Science* 334.6056, S. 623–628.
- Hoe, H.-S., Z. Fu, A. Makarova u. a. (März 2009). “The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity.” In: *J Biol Chem* 284.13, S. 8495–8506.
- Hoe, H.-S., H.-K. Lee und D. T. S. Pak (Jan. 2012). “The upside of APP at synapses.” In: *CNS Neurosci Ther* 18.1, S. 47–56.
- Hof, P. R., K. Cox und J. H. Morrison (Nov. 1990a). “Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer’s disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex.” In: *J Comp Neurol* 301.1, S. 44–54.
- Hof, P. R. und J. H. Morrison (Nov. 1990b). “Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer’s disease: II. Primary and secondary visual cortex.” In: *J Comp Neurol* 301.1, S. 55–64.
- Hofer, S. B., T. D. Mrsic-Flogel, T. Bonhoeffer und M. Hübener (Jan. 2009). “Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits.” In: *Nature* 457.7227, S. 313–317.
- Hollingsworth, P., D. Harold, R. Sims u. a. (Mai 2011). “Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer’s disease.” In: *Nat Genet* 43.5, S. 429–435.
- Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson u. a. (Juli 2008). “Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer’s disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial.” In: *Lancet* 372.9634, S. 216–223.
- Holmes, T. J., D. Biggs und A. Abu-Tarif (Aug. 2006). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Hrsg. von J. B. Pawley. 3rd. Springer, S. 468–487.
- Holtmaat, A., T. Bonhoeffer, D. K. Chow u. a. (2009). “Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window.” In: *Nat Protoc* 4.8, S. 1128–1144.

- Holtmaat, A., J. T. Trachtenberg, L. Wilbrecht u. a. (Jan. 2005). "Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo." In: *Neuron* 45.2, S. 279–291.
- Holtmaat, A., L. Wilbrecht, G. W. Knott, E. Welker und K. Svoboda (Juni 2006). "Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex." In: *Nature* 441.7096, S. 979–983.
- Holtzman, D. M., A. Goate, J. Kelly und R. Sperling (Dez. 2011a). "Mapping the road forward in Alzheimer's disease." In: *Sci Transl Med* 3.114, 114ps48.
- Holtzman, D. M., J. C. Morris und A. M. Goate (Apr. 2011b). "Alzheimer's disease: the challenge of the second century." In: *Sci Transl Med* 3.77, 77sr1.
- Honer, W. G., D. W. Dickson, J. Gleeson und P. Davies (1992). "Regional synaptic pathology in Alzheimer's disease." In: *Neurobiol Aging* 13.3, S. 375–382.
- Hortschansky, P., V. Schroeckh, T. Christopeit, G. Zandomenighi und M. Fändrich (Juli 2005). "The aggregation kinetics of Alzheimer's β -amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation." In: *Protein Sci* 14.7, S. 1753–1759.
- Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen u. a. (Okt. 1996). "Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." In: *Science* 274.5284, S. 99–102.
- Huang, Y. und L. Mucke (März 2012). "Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies." In: *Cell* 148.6, S. 1204–1222.
- Huber, G., Y. Bailly, J. R. Martin, J. Mariani und B. Brugg (Sep. 1997). "Synaptic β -amyloid precursor proteins increase with learning capacity in rats." In: *Neuroscience* 80.2, S. 313–320.
- Hussain, I., D. Powell, D. R. Howlett u. a. (Dez. 1999). "Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase." In: *Mol Cell Neurosci* 14.6, S. 419–427.
- Hutton, M., C. L. Lendon, P. Rizzu u. a. (Juni 1998). "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17." In: *Nature* 393.6686, S. 702–705.
- Hyman, B. T., K. Marzloff und P. V. Arriagada (Nov. 1993). "The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution." In: *J Neuropathol Exp Neurol* 52.6, S. 594–600.
- Hyman, B. T., H. L. West, G. W. Rebeck u. a. (Apr. 1995). "Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer disease: observation of log-normal size distribution and molecular epidemiology of differences associated with apolipoprotein E ge-

- notype and trisomy 21 (Down syndrome).” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92.8, S. 3586–3590.
- Ida, N., T. Hartmann, J. Pantel u. a. (Sep. 1996). “Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay.” In: *J Biol Chem* 271.37, S. 22908–22914.
- Iqbal, K. und I. Grundke-Iqbal (Juni 2002). “Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease.” In: *J Alzheimers Dis* 4.3, S. 235–238.
- Itagaki, S., P. L. McGeer, H. Akiyama, S. Zhu und D. Selkoe (Okt. 1989). “Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease.” In: *J Neuroimmunol* 24.3, S. 173–182.
- Ittner, L. M. und J. Götz (Feb. 2011). “Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer’s disease.” In: *Nat Rev Neurosci* 12.2, S. 65–72.
- Ittner, L. M., Y. D. Ke, F. Delerue u. a. (Aug. 2010). “Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer’s disease mouse models.” In: *Cell* 142.3, S. 387–397.
- Jack Jr, C. R., D. S. Knopman, W. J. Jagust u. a. (Jan. 2010). “Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer’s pathological cascade.” In: *Lancet Neurol* 9.1, S. 119–128.
- Jack Jr, C. R., V. J. Lowe, S. D. Weigand u. a. (Mai 2009). “Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer’s disease.” In: *Brain* 132.Pt 5, S. 1355–1365.
- Jack Jr, C. R., H. J. Wiste, T. G. Lesnick u. a. (März 2013). “Brain β -amyloid load approaches a plateau.” In: *Neurology* 80.10, S. 890–896.
- Jacobs, S. A. und J. Z. Tsien (2012). “Genetic overexpression of NR2B subunit enhances social recognition memory for different strains and species.” In: *PLoS One* 7.4, e36387.
- Jacobsen, J. S., C.-C. Wu, J. M. Redwine u. a. (März 2006). “Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103.13, S. 5161–5166.
- Jagust, W. J., D. Bandy, K. Chen u. a. (Mai 2010). “The Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative positron emission tomography core.” In: *Alzheimers Dement* 6.3, S. 221–229.

- Jankowsky, J. L., D. J. Fadale, J. Anderson u. a. (Jan. 2004). "Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase." In: *Hum Mol Genet* 13.2, S. 159–170.
- Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin u. a. (2000). "A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease." In: *Nature* 408.6815, S. 979–982.
- Jarrett, J. T. und P. Lansbury, Jr (Juni 1993). "Seeding „one-dimensional crystallization“ of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" In: *Cell* 73.6, S. 1055–1058.
- Jonsson, T., J. K. Atwal, S. Steinberg u. a. (Aug. 2012). "A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline." In: *Nature* 488.7409, S. 96–99.
- Jucker, M. (Nov. 2010). "The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases." In: *Nat Med* 16.11, S. 1210–1214.
- Jung, C. K. E. und J. Herms (Apr. 2012a). "Role of APP for dendritic spine formation and stability." In: *Exp Brain Res* 217.3-4, S. 463–470.
- (Okt. 2012b). "Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: An in vivo imaging study." In: *Cereb Cortex*.
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel u. a. (Juni 2000). "Analysis of fractalkine receptor CX₃CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion." In: *Mol Cell Biol* 20.11, S. 4106–4114.
- Kadir, A., O. Almkvist, A. Forsberg u. a. (Jan. 2012). "Dynamic changes in PET amyloid and FDG imaging at different stages of Alzheimer's disease." In: *Neurobiol Aging* 33.1, 198.e1–198.14.
- Kadir, A., N. Andreasen, O. Almkvist u. a. (Mai 2008). "Effect of phenserine treatment on brain functional activity and amyloid in Alzheimer's disease." In: *Ann Neurol* 63.5, S. 621–631.
- Kadir, A., A. Marutle, D. Gonzalez u. a. (Jan. 2011). "Positron emission tomography imaging and clinical progression in relation to molecular pathology in the first Pittsburgh Compound B positron emission tomography patient with Alzheimer's disease." In: *Brain* 134.Pt 1, S. 301–317.
- Kamenetz, F., T. Tomita, H. Hsieh u. a. (März 2003). "APP processing and synaptic function." In: *Neuron* 37.6, S. 925–937.

- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck u. a. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." In: *Nature* 325.6106, S. 733–736.
- Kasai, H., M. Matsuzaki, J. Noguchi, N. Yasumatsu und H. Nakahara (Juli 2003). "Structure-stability-function relationships of dendritic spines." In: *Trends Neurosci* 26.7, S. 360–368.
- Kaufer, D. und S. Gandy (Dez. 2009). "APOE ϵ 4 and bapineuzumab: Infusing pharmacogenomics into Alzheimer disease therapeutics." In: *Neurology* 73.24, S. 2052–2053.
- Kawarabayashi, T., L. H. Younkin, T. C. Saido, M. Shoji, K. H. Ashe und S. G. Younkin (Jan. 2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." In: *J Neurosci* 21.2, S. 372–381.
- Keck, T., T. D. Mrsic-Flogel, M. V. Afonso, U. T. Eysel, T. Bonhoeffer und M. Hübener (Okt. 2008). "Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex." In: *Nat Neurosci* 11.10, S. 1162–1167.
- Kettenmann, H., U.-K. Hanisch, M. Noda und A. Verkhratsky (Apr. 2011). "Physiology of microglia." In: *Physiol Rev* 91.2, S. 461–553.
- Kim, J., J. M. Basak und D. M. Holtzman (Aug. 2009). "The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease." In: *Neuron* 63.3, S. 287–303.
- Kirazov, E., L. Kirazov, V. Bigl und R. Schliebs (Juni 2001). "Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo." In: *Int J Dev Neurosci* 19.3, S. 287–296.
- Kleinfeld, D., P. P. Mitra, F. Helmchen und W. Denk (Dez. 1998). "Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.26, S. 15741–15746.
- Klunk, W. E., B. J. Bacsikai, C. A. Mathis u. a. (Sep. 2002). "Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative." In: *J Neuropathol Exp Neurol* 61.9, S. 797–805.

- Klunk, W. E., H. Engler, A. Nordberg u. a. (März 2004). "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B." In: *Ann Neurol* 55.3, S. 306–319.
- Knafo, S., L. Alonso-Nanclares, J. Gonzalez-Soriano u. a. (März 2009). "Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease." In: *Cereb Cortex* 19.3, S. 586–592.
- Knobloch, M. und I. M. Mansuy (Feb. 2008). "Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease." In: *Mol Neurobiol* 37.1, S. 73–82.
- Knott, G. W. und A. Holtmaat (Aug. 2008). "Dendritic spine plasticity—current understanding from in vivo studies." In: *Brain Res Rev* 58.2, S. 282–289.
- Knott, G. W., A. Holtmaat, L. Wilbrecht, E. Welker und K. Svoboda (Sep. 2006). "Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo." In: *Nat Neurosci* 9.9, S. 1117–1124.
- Koffie, R. M., M. Meyer-Luehmann, T. Hashimoto u. a. (März 2009). "Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106.10, S. 4012–4017.
- Koivunen, J., N. Scheinin, J. R. Virta u. a. (März 2011). "Amyloid PET imaging in patients with mild cognitive impairment: a 2-year follow-up study." In: *Neurology* 76.12, S. 1085–1090.
- Koo, E. H., S. S. Sisodia, D. R. Archer u. a. (Feb. 1990). "Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87.4, S. 1561–1565.
- Krech, D., M. R. Rosenzweig und E. L. Bennett (Dez. 1960). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry." In: *J Comp Physiol Psychol* 53, S. 509–519.
- Kuhn, P.-H., H. Wang, B. Dislich u. a. (Sep. 2010). "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." In: *EMBO J* 29.17, S. 3020–3032.
- Lai, C. S. W., T. F. Franke und W.-B. Gan (März 2012). "Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling." In: *Nature* 483.7387, S. 87–91.
- Lai, F. und R. S. Williams (Aug. 1989). "A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome." In: *Arch Neurol* 46.8, S. 849–853.

- Lambert, M. P., A. K. Barlow, B. A. Chromy u. a. (Mai 1998). “Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.11, S. 6448–6453.
- Lanz, T. A., D. B. Carter und K. M. Merchant (Aug. 2003). “Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype.” In: *Neurobiol Dis* 13.3, S. 246–253.
- Lassalle, J. M., H. Halley, S. Daumas, L. Verret und B. Francés (Aug. 2008). “Effects of the genetic background on cognitive performances of TG2576 mice.” In: *Behav Brain Res* 191.1, S. 104–110.
- Lassmann, H., P. Fischer und K. Jellinger (Sep. 1993). “Synaptic pathology of Alzheimer’s disease.” In: *Ann N Y Acad Sci* 695, S. 59–64.
- Lassmann, H., R. Weiler, P. Fischer u. a. (1992). “Synaptic pathology in Alzheimer’s disease: immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles.” In: *Neuroscience* 46.1, S. 1–8.
- Lee, D. C., J. Rizer, J. B. Hunt, M.-L. B. Selenica, M. N. Gordon und D. Morgan (Feb. 2013). “Experimental manipulations of microglia in mouse models of Alzheimer’s pathology. Activation reduces amyloid but hastens tau pathology.” In: *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, S. 69–85.
- Lee, E. B., L. Z. Leng, B. Zhang u. a. (Feb. 2006). “Targeting amyloid- β peptide (A β) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in A β precursor protein (APP) transgenic mice.” In: *J Biol Chem* 281.7, S. 4292–4299.
- Lee, K. J., C. E. H. Moussa, Y. Lee u. a. (Aug. 2010). “ β amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines.” In: *Neuroscience* 169.1, S. 344–356.
- Lee, S., N. H. Varvel, M. E. Konerth u. a. (Nov. 2010). “CX₃CR1 deficiency alters microglial activation and reduces β -amyloid deposition in two Alzheimer’s disease mouse models.” In: *Am J Pathol* 177.5, S. 2549–2562.
- Lee, Y., J. H. Back, J. Kim u. a. (März 2010). “Systematic review of health behavioral risks and cognitive health in older adults.” In: *Int Psychogeriatr* 22.2, S. 174–187.
- Lemere, C. A. und E. Masliah (Feb. 2010). “Can Alzheimer disease be prevented by amyloid- β immunotherapy?” In: *Nat Rev Neurol* 6.2, S. 108–119.
- Lemmens, M. A. M., H. W. M. Steinbusch, B. P. F. Rutten und C. Schmitz (Nov. 2010). “Advanced microscopy techniques for quantitative analysis in neuromor-

- phology and neuropathology research: current status and requirements for the future.” In: *J Chem Neuroanat* 40.3, S. 199–209.
- Lesné, S. E., M. T. Koh, L. Kotilinek u. a. (März 2006). “A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory.” In: *Nature* 440.7082, S. 352–357.
- Lesné, S. E., M. A. Sherman, M. Grant u. a. (Mai 2013). “Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer’s disease.” In: *Brain* 136.Pt 5, S. 1383–1398.
- Levites, Y., P. Das, R. W. Price u. a. (Jan. 2006a). “Anti-A β_{42} - and anti-A β_{40} -specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model.” In: *J Clin Invest* 116.1, S. 193–201.
- Levites, Y., L. A. Smithson, R. W. Price u. a. (Dez. 2006b). “Insights into the mechanisms of action of anti-A β antibodies in Alzheimer’s disease mouse models.” In: *FASEB J* 20.14, S. 2576–2578.
- Lewis, J., D. W. Dickson, W. L. Lin u. a. (Aug. 2001). “Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP.” In: *Science* 293.5534, S. 1487–1491.
- Liebscher, S. und M. Meyer-Luehmann (Apr. 2012). “A peephole into the brain: neuropathological features of Alzheimer’s disease revealed by in vivo two-photon imaging.” In: *Front Psychiatry* 3, S. 26.
- Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti und J. Tang (Feb. 2000). “Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97.4, S. 1456–1460.
- Lippman, J. und A. Dunaevsky (Juli 2005). “Dendritic spine morphogenesis and plasticity.” In: *J Neurobiol* 64.1, S. 47–57.
- Liu, Y.-H., B. Giunta, H.-D. Zhou, J. Tan und Y.-J. Wang (Aug. 2012). “Immunotherapy for Alzheimer disease: the challenge of adverse effects.” In: *Nat Rev Neurol* 8.8, S. 465–469.
- Liu, Z., C. Condello, A. Schain, R. Harb und J. Grutzendler (Dez. 2010). “CX₃CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid- β phagocytosis.” In: *J Neurosci* 30.50, S. 17091–17101.
- Lomakin, A., D. S. Chung, G. B. Benedek, D. A. Kirschner und D. B. Teplow (Feb. 1996). “On the nucleation and growth of amyloid β -protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93.3, S. 1125–1129.

- Lomakin, A., D. B. Teplow, D. A. Kirschner und G. B. Benedek (Juli 1997). “Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94.15, S. 7942–7947.
- Lue, L. F., Y. M. Kuo, A. E. Roher u. a. (Sep. 1999). “Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer’s disease.” In: *Am J Pathol* 155.3, S. 853–862.
- Lyckman, A. W., A. M. Confaloni, G. Thinakaran, S. S. Sisodia und K. L. Moya (Mai 1998). “Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system.” In: *J Biol Chem* 273.18, S. 11100–11106.
- Lynch, M. A. (Jan. 2004). “Long-term potentiation and memory.” In: *Physiol Rev* 84.1, S. 87–136.
- (Okt. 2009). “The multifaceted profile of activated microglia.” In: *Mol Neurobiol* 40.2, S. 139–156.
- Mahadomrongkul, V., P. T. Huerta, T. Shirao und C. Aoki (Dez. 2005). “Stability of the distribution of spines containing drebrin A in the sensory cortex layer I of mice expressing mutated APP and PS1 genes.” In: *Brain Res* 1064.1-2, S. 66–74.
- Maier, M., T. J. Seabrook, N. D. Lazo u. a. (Mai 2006). “Short amyloid- β ($A\beta$) immunogens reduce cerebral $A\beta$ load and learning deficits in an Alzheimer’s disease mouse model in the absence of an $A\beta$ -specific cellular immune response.” In: *J Neurosci* 26.18, S. 4717–4728.
- Mairet-Coello, G., J. Curchet, S. Pieraut, V. Curchet, A. Maximov und F. Polleux (Apr. 2013). “The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of $A\beta$ oligomers through tau phosphorylation.” In: *Neuron* 78.1, S. 94–108.
- Majocha, R. E., F. M. Benes, J. L. Reifel, A. M. Rodenrys und C. A. Marotta (Aug. 1988). “Laminar-specific distribution and infrastructural detail of amyloid in the Alzheimer disease cortex visualized by computer-enhanced imaging of epitopes recognized by monoclonal antibodies.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85.16, S. 6182–6186.
- Maletic-Savatic, M., R. Malinow und K. Svoboda (März 1999). “Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity.” In: *Science* 283.5409, S. 1923–1927.
- Mandelkow, E. M., J. Biernat, G. Drewes, N. Gustke, B. Trinczek und E. Mandelkow (1995). “Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules.” In: *Neurobiol Aging* 16.3, S. 355–63.

- Mandelkow, E. M. und E. Mandelkow (1994). "Tau protein and Alzheimer's disease." In: *Neurobiol Aging* 15 Suppl 2, S85–S86.
- (Nov. 1998). "Tau in Alzheimer's disease." In: *Trends Cell Biol* 8.11, S. 425–427.
- (Juli 2012). "Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration." In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.7, a006247.
- Mandybur, T. I. (Feb. 1975). "The incidence of cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease." In: *Neurology* 25.2, S. 120–126.
- Masliah, E., M. Mallory, L. Hansen u. a. (1991). "Immunoreactivity of CD45, a protein phosphotyrosine phosphatase, in Alzheimer's disease." In: *Acta Neuropathol* 83.1, S. 12–20.
- Masliah, E., R. D. Terry, R. M. DeTeresa und L. A. Hansen (Aug. 1989). "Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease." In: *Neurosci Lett* 103.2, S. 234–239.
- Masters, C. L. und K. Beyreuther (2006). "Pathways to the discovery of the A β amyloid of Alzheimer's disease." In: *J Alzheimers Dis* 9.3 Suppl, S. 155–161.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald und K. Beyreuther (Juni 1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 82.12, S. 4245–4249.
- Mathis, C. A., Y. Wang, D. P. Holt, G.-F. Huang, M. L. Debnath und W. E. Klunk (Juni 2003). "Synthesis and evaluation of ^{11}C -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents." In: *J Med Chem* 46.13, S. 2740–2754.
- Matousek, S. B., S. Ghosh, S. S. Shaftel, S. Kyrkanides, J. A. Olschowka und M. K. O'Banion (März 2012). "Chronic IL-1 β -mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration." In: *J Neuroimmune Pharmacol* 7.1, S. 156–164.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, G. C. R. Ellis-Davies und H. Kasai (Juni 2004). "Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines." In: *Nature* 429.6993, S. 761–766.
- Mattsson, N., K. Blennow und H. Zetterberg (Okt. 2009). "CSF biomarkers: pinpointing Alzheimer pathogenesis." In: *Ann N Y Acad Sci* 1180, S. 28–35.
- McGowan, E., F. Pickford, J. Kim u. a. (Juli 2005). "A β 42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice." In: *Neuron* 47.2, S. 191–199.

- McLean, C. A., R. A. Cherny, F. W. Fraser u. a. (Dez. 1999). “Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer’s disease.” In: *Ann Neurol* 46.6, S. 860–866.
- Meinhardt, J. und M. Fändrich (Mai 2009). “Structure of amyloid fibrils.” In: *Pathologie* 30.3, S. 175–181.
- Merchán-Pérez, A., J.-R. Rodríguez, S. González u. a. (Jan. 2013). “Three-dimensional spatial distribution of synapses in the neocortex: a dual-beam electron microscopy study.” In: *Cereb Cortex*.
- Merino-Serrais, P., S. Knafo, L. Alonso-Nanclares, I. Fernaud-Espinosa und J. De-Felipe (Okt. 2011). “Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *Hippocampus* 21.10, S. 1037–1044.
- Meyer-Luehmann, M., T. L. Spires-Jones, C. Prada u. a. (Feb. 2008). “Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *Nature* 451.7179, S. 720–724.
- Meziane, H., J. C. Dodart, C. Mathis u. a. (Okt. 1998). “Memory-enhancing effects of secreted forms of the β -amyloid precursor protein in normal and amnesic mice.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.21, S. 12683–12688.
- Micheva, K. D., B. Busse, N. C. Weiler, N. O’Rourke und S. J. Smith (Nov. 2010). “Single-synapse analysis of a diverse synapse population: proteomic imaging methods and markers.” In: *Neuron* 68.4, S. 639–653.
- Micheva, K. D. und S. J. Smith (Juli 2007). “Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits.” In: *Neuron* 55.1, S. 25–36.
- Morgan, D., D. M. Diamond, P. E. Gottschall u. a. (2000). “A β peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer’s disease.” In: *Nature* 408.6815, S. 982–985.
- Mori, T., J. Maeda, H. Shimada u. a. (Juni 2012). “Molecular imaging of dementia.” In: *Psychogeriatrics* 12.2, S. 106–114.
- Morris, A. M., M. A. Watzky und R. G. Finke (März 2009). “Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature.” In: *Biochim Biophys Acta* 1794.3, S. 375–397.
- Mucke, L., E. Masliah, G. Q. Yu u. a. (Juni 2000). “High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation.” In: *J Neurosci* 20.11, S. 4050–4058.

- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman u. a. (Aug. 1992). "A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid." In: *Nat Genet* 1.5, S. 345–347.
- Mullard, A. (Sep. 2012). "Sting of Alzheimer's failures offset by upcoming prevention trials." In: *Nat Rev Drug Discov* 11.9, S. 657–660.
- Murphy, R. M. (Aug. 2007). "Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins." In: *Biochim Biophys Acta* 1768.8, S. 1923–1934.
- Nägerl, V. U., N. Eberhorn, S. B. Cambridge und T. Bonhoeffer (Dez. 2004). "Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons." In: *Neuron* 44.5, S. 759–767.
- Nägerl, V. U., G. Köstinger, J. C. Anderson, K. A. C. Martin und T. Bonhoeffer (Juli 2007). "Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons." In: *J Neurosci* 27.30, S. 8149–8156.
- Naj, A. C., G. Jun, G. W. Beecham u. a. (Mai 2011). "Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease." In: *Nat Genet* 43.5, S. 436–441.
- Nelson, P. T., I. Alafuzoff, E. H. Bigio u. a. (Mai 2012). "Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature." In: *J Neuropathol Exp Neurol* 71.5, S. 362–381.
- Nicodemi, M., A. de Candia und A. Coniglio (Okt. 2009). "Aggregation of fibrils and plaques in amyloid molecular systems." In: *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 80.4 Pt 1, S. 041914.
- Nielsen, L., R. Khurana, A. Coats u. a. (Mai 2001). "Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism." In: *Biochemistry* 40.20, S. 6036–6046.
- Nimchinsky, E. A., B. L. Sabatini und K. Svoboda (2002). "Structure and function of dendritic spines." In: *Annu Rev Physiol* 64, S. 313–353.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff und F. Helmchen (Mai 2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." In: *Science* 308.5726, S. 1314–1318.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, J. N. D. Kerr und F. Helmchen (Okt. 2004). "Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo." In: *Nat Methods* 1.1, S. 31–37.

- Nordberg, A. (Sep. 2004). "PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease." In: *Lancet Neurol* 3.9, S. 519–527.
- Nussbaum, J. M., S. Schilling, H. Cynis u. a. (Mai 2012). "Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β ." In: *Nature* 485.7400, S. 651–655.
- O'Brien, R. J. und P. C. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." In: *Annu Rev Neurosci* 34, S. 185–204.
- O'Callaghan, J. P. (Mai 1993). "Quantitative features of reactive gliosis following toxicant-induced damage of the CNS." In: *Ann N Y Acad Sci* 679, S. 195–210.
- (1994). "Biochemical analysis of glial fibrillary acidic protein as a quantitative approach to neurotoxicity assessment: advantages, disadvantages and application to the assessment of NMDA receptor antagonist-induced neurotoxicity." In: *Psychopharmacol Bull* 30.4, S. 549–554.
- O'Callaghan, J. P. und K. Sriram (Mai 2005). "Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity." In: *Expert Opin Drug Saf* 4.3, S. 433–442.
- Oddo, S., V. Vasilevko, A. Caccamo, M. Kitazawa, D. H. Cribbs und F. M. LaFerla (Dez. 2006). "Reduction of soluble A β and tau, but not soluble A β alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles." In: *J Biol Chem* 281.51, S. 39413–39423.
- Okamoto, K.-I., T. Nagai, A. Miyawaki und Y. Hayashi (Okt. 2004). "Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity." In: *Nat Neurosci* 7.10, S. 1104–1112.
- Olson, M. I. und C. M. Shaw (März 1969). "Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism." In: *Brain* 92.1, S. 147–156.
- Parekh, R. und G. A. Ascoli (März 2013). "Neuronal morphology goes digital: a research hub for cellular and system neuroscience." In: *Neuron* 77.6, S. 1017–1038.
- Paresce, D. M., R. N. Ghosh und F. R. Maxfield (Sep. 1996). "Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid β -protein via a scavenger receptor." In: *Neuron* 17.3, S. 553–565.
- Paxinos, G. und K. B. J. Franklin (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edition. Academic Press.
- Pellarin, R. und A. Cafisch (Juli 2006). "Interpreting the aggregation kinetics of amyloid peptides." In: *J Mol Biol* 360.4, S. 882–892.

- Penzes, P., M. E. Cahill, K. A. Jones, J.-E. VanLeeuwen und K. M. Woolfrey (März 2011). “Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders.” In: *Nat Neurosci* 14.3, S. 285–293.
- Perez-Cruz, C., M. W. Nolte, M. M. van Gaalen u. a. (März 2011). “Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer’s disease.” In: *J Neurosci* 31.10, S. 3926–3934.
- Peters, A. und I. R. Kaiserman-Abramof (Apr. 1970). “The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines.” In: *Am J Anat* 127.4, S. 321–355.
- Pfeifer, M., S. Boncristiano, L. Bondolfi u. a. (Nov. 2002). “Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy.” In: *Science* 298.5597, S. 1379.
- Pittet, M. J. und R. Weissleder (Nov. 2011). “Intravital imaging.” In: *Cell* 147.5, S. 983–991.
- Poorkaj, P., T. D. Bird, E. Wijsman u. a. (Juni 1998). “Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia.” In: *Ann Neurol* 43.6, S. 815–825.
- Pozueta, J., R. Lefort und M. L. Shelanski (Juni 2012). “Synaptic changes in Alzheimer’s disease and its models.” In: *Neuroscience* in press.
- Prince, M., R. Bryce und C. Ferri (Sep. 2011). *World Alzheimer Report 2011*. Techn. Ber. Alzheimer Disease International.
- Prinz, M., J. Priller, S. S. Sisodia und R. M. Ransohoff (Okt. 2011). “Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration.” In: *Nat Neurosci* 14.10, S. 1227–1235.
- Puzzo, D. und O. Arancio (2013). “Amyloid- β Peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?” In: *J Alzheimers Dis* 33.Suppl 1, S111–S120.
- Puzzo, D., L. Privitera, M. Fà u. a. (Mai 2011). “Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory.” In: *Ann Neurol* 69.5, S. 819–830.
- Puzzo, D., L. Privitera, E. Leznik u. a. (Dez. 2008). “Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus.” In: *J Neurosci* 28.53, S. 14537–14545.
- Racke, M. M., L. I. Boone, D. L. Hepburn u. a. (Jan. 2005). “Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid β .” In: *J Neurosci* 25.3, S. 629–636.

- Radde, R., T. Bolmont, S. A. Kaeser u. a. (Sep. 2006). "A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology." In: *EMBO Rep* 7.9, S. 940–946.
- Radde, R., C. Duma, M. Goedert und M. Jucker (März 2008). "The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease." In: *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 Suppl 1, S70–S74.
- Ramón y Cajal, S. (1888). "Estructura de los centros nerviosos de las aves." In: *Rev Trim Histol Norm Patol* 1, S. 1–10.
- Rampon, C. und J. Z. Tsien (2000). "Genetic analysis of learning behavior-induced structural plasticity." In: *Hippocampus* 10.5, S. 605–609.
- Rapoport, M., H. N. Dawson, L. I. Binder, M. P. Vitek und A. Ferreira (Apr. 2002). "Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99.9, S. 6364–6369.
- Rinne, J. O., D. J. Brooks, M. N. Rossor u. a. (Apr. 2010). "¹¹C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid- β load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study." In: *Lancet Neurol* 9.4, S. 363–372.
- Robakis, N. K., N. Ramakrishna, G. Wolfe und H. M. Wisniewski (Juni 1987). "Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84.12, S. 4190–4194.
- Roberson, E. D., B. Halabisky, J. W. Yoo u. a. (Jan. 2011). "Amyloid- β /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease." In: *J Neurosci* 31.2, S. 700–711.
- Roberson, E. D., K. Scarce-Levie, J. J. Palop u. a. (Mai 2007). "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." In: *Science* 316.5825, S. 750–754.
- Robert, R., M.-P. Lefranc, A. Ghochikyan u. a. (2010). "Restricted V gene usage and VH/VL pairing of mouse humoral response against the N-terminal immunodominant epitope of the amyloid β peptide." In: *Mol Immunol* 48.1-3, S. 59–72.
- Robert, R. und K. L. Wark (Okt. 2012). "Engineered antibody approaches for Alzheimer's disease immunotherapy." In: *Arch Biochem Biophys* 526.2, S. 132–138.

- Roberts, T. F., K. A. Tschida, M. E. Klein und R. Mooney (Feb. 2010). "Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning." In: *Nature* 463.7283, S. 948–952.
- Rocher, A. B., M. S. Kinson und J. I. Luebke (Nov. 2008). "Significant structural but not physiological changes in cortical neurons of 12-month-old Tg2576 mice." In: *Neurobiol Dis* 32.2, S. 309–318.
- Rogers, J., J. Lubner-Narod, S. D. Styren und W. H. Civin (1988). "Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease." In: *Neurobiol Aging* 9.4, S. 339–349.
- Rosenzweig, M. R., D. Krech, E. L. Bennett und M. C. Diamond (Aug. 1962). "Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension." In: *J Comp Physiol Psychol* 55, S. 429–437.
- Rutten, B. P. F., N. M. Van der Kolk, S. Schafer u. a. (Juli 2005). "Age-related loss of synaptophysin immunoreactive presynaptic boutons within the hippocampus of APP751SL, PS1M146L, and APP751SL/PS1M146L transgenic mice." In: *Am J Pathol* 167.1, S. 161–173.
- Salloway, S., R. Sperling, S. Gilman u. a. (Dez. 2009). "A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease." In: *Neurology* 73.24, S. 2061–2070.
- Savonenko, A., G. M. Xu, T. Melnikova u. a. (Apr. 2005). "Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to β -amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities." In: *Neurobiol Dis* 18.3, S. 602–617.
- Savva, G. M., B. C. M. Stephan und Alzheimer's Society Vascular Dementia Systematic Review Group (Jan. 2010). "Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review." In: *Stroke* 41.1, e41–e46.
- Scheff, S. W., S. T. DeKosky und D. A. Price (1990). "Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease." In: *Neurobiol Aging* 11.1, S. 29–37.
- Scheff, S. W. und D. A. Price (Dez. 2003). "Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies." In: *Neurobiol Aging* 24.8, S. 1029–1046.

- Scheff, S. W., D. A. Price, F. A. Schmitt, S. T. DeKosky und E. J. Mufson (Mai 2007). "Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment." In: *Neurology* 68.18, S. 1501–1508.
- Scheff, S. W., L. Sparks und D. A. Price (Sep. 1993). "Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease." In: *Ann Neurol* 34.3, S. 356–361.
- Scheinin, N. M., S. Aalto, J. Koikkalainen u. a. (Okt. 2009). "Follow-up of [¹¹C]PIB uptake and brain volume in patients with Alzheimer disease and controls." In: *Neurology* 73.15, S. 1186–1192.
- Schellenberg, G. D. und T. J. Montine (Sep. 2012). "The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease." In: *Acta Neuropathol* 124.3, S. 305–323.
- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn u. a. (Juli 1999). "Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." In: *Nature* 400.6740, S. 173–177.
- Schmitz, C. und P. R. Hof (2005). "Design-based stereology in neuroscience." In: *Neuroscience* 130.4, S. 813–831.
- (2007). *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*. Hrsg. von D. R. Riddle. CRC Press, S. 63–96.
- Schubert, W., R. Prior, A. Weidemann u. a. (Nov. 1991). "Localization of Alzheimer β A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites." In: *Brain Res* 563.1-2, S. 184–194.
- Segal, M. (Apr. 2005). "Dendritic spines and long-term plasticity." In: *Nat Rev Neurosci* 6.4, S. 277–284.
- Selkoe, D. J. (Apr. 1991). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." In: *Neuron* 6.4, S. 487–498.
- (Apr. 2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." In: *Physiol Rev* 81.2, S. 741–766.
- (Okt. 2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." In: *Science* 298.5594, S. 789–791.
- (Sep. 2011). "Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics." In: *Nat Med* 17.9, S. 1060–1065.
- (Sep. 2012). "Preventing Alzheimer's disease." In: *Science* 337.6101, S. 1488–1492.

- Selkoe, D. J. und R. Kopan (2003). "Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration." In: *Annu Rev Neurosci* 26, S. 565–597.
- Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, E. Masliah und B. T. Hyman (Sep. 2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 1.1, a006189.
- Serrano-Pozo, A., M. L. Mielke, A. Muzitansky u. a. (Aug. 2012). "Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease." In: *J Neuropathol Exp Neurol* 71.8, S. 694–701.
- Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, F. Esch u. a. (Sep. 1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids." In: *Nature* 359.6393, S. 325–327.
- Shaner, N. C., P. A. Steinbach und R. Y. Tsien (Dez. 2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." In: *Nat Methods* 2.12, S. 905–909.
- Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta u. a. (Aug. 2008). "Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." In: *Nat Med* 14.8, S. 837–842.
- Shen, J. und R. J. Kelleher 3rd (Jan. 2007). "The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104.2, S. 403–409.
- Sheng, M., B. L. Sabatini und T. C. Südhof (Mai 2012). "Synapses and Alzheimer's disease." In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.5, a005777.
- Shepherd, C., H. McCann und G. M. Halliday (Juli 2009). "Variations in the neuropathology of familial Alzheimer's disease." In: *Acta Neuropathol* 118.1, S. 37–52.
- Shigematsu, K., P. L. McGeer und E. G. McGeer (Okt. 1992). "Localization of amyloid precursor protein in selective postsynaptic densities of rat cortical neurons." In: *Brain Res* 592.1-2, S. 353–357.
- Shoji, M., T. E. Golde, J. Ghiso u. a. (Okt. 1992). "Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing." In: *Science* 258.5079, S. 126–129.
- Sholl, D. A. (Okt. 1953). "Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat." In: *J Anat* 87.4, S. 387–406.

- Sinha, S., J. P. Anderson, R. Barbour u. a. (Dez. 1999). "Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain." In: *Nature* 402.6761, S. 537–540.
- Sisodia, S. S., E. H. Koo, K. Beyreuther, A. Unterbeck und D. L. Price (Apr. 1990). "Evidence that β -amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing." In: *Science* 248.4954, S. 492–495.
- Sisodia, S. S., E. H. Koo, P. N. Hoffman, G. Perry und D. L. Price (Juli 1993). "Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system." In: *J Neurosci* 13.7, S. 3136–3142.
- Skoch, J., G. A. Hickey, S. T. Kajdasz, B. T. Hyman und B. J. Bacskai (2005). "In vivo imaging of amyloid- β deposits in mouse brain with multiphoton microscopy." In: *Methods Mol Biol* 299, S. 349–363.
- Sojkova, J., Y. Zhou, Y. An u. a. (Mai 2011). "Longitudinal patterns of β -amyloid deposition in nondemented older adults." In: *Arch Neurol* 68.5, S. 644–649.
- Sperling, R. A., P. S. Aisen, L. A. Beckett u. a. (Mai 2011). "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." In: *Alzheimers Dement* 7.3, S. 280–292.
- Spillantini, M. G., T. D. Bird und B. Ghetti (Apr. 1998). "Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies." In: *Brain Pathol* 8.2, S. 387–402.
- Spires, T. L., M. Meyer-Luehmann, E. A. Stern u. a. (Aug. 2005). "Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy." In: *J Neurosci* 25.31, S. 7278–7287.
- Spires-Jones, T. L. und S. Knafo (2012). "Spines, plasticity, and cognition in Alzheimer's model mice." In: *Neural Plast* 2012, Article ID 319836, 10 Seiten.
- Spires-Jones, T. L., M. Meyer-Luehmann, J. D. Osetek u. a. (Okt. 2007). "Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model." In: *Am J Pathol* 171.4, S. 1304–1311.
- Stence, N., M. Waite und M. E. Dailey (März 2001). "Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices." In: *Glia* 33.3, S. 256–266.
- Streit, W. J., S. A. Walter und N. A. Pennell (Apr. 1999). "Reactive microgliosis." In: *Prog Neurobiol* 57.6, S. 563–581.

- Südhof, T. C. (Juni 1995). "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions." In: *Nature* 375.6533, S. 645–653.
- Sundström, A., P. Marklund, L.-G. Nilsson u. a. (Juni 2004). "APOE influences on neuropsychological function after mild head injury: within-person comparisons." In: *Neurology* 62.11, S. 1963–1966.
- Sundström, A., L.-G. Nilsson, M. Cruts, R. Adolfsson, C. Van Broeckhoven und L. Nyberg (Feb. 2007). "Increased risk of dementia following mild head injury for carriers but not for non-carriers of the APOE ϵ 4 allele." In: *Int Psychogeriatr* 19.1, S. 159–165.
- Sütterlin, S., I. Hoßmann und R. Klingholz (Feb. 2011). *Demenz-Report*. Techn. Ber. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung.
- Svoboda, K., W. Denk, D. Kleinfeld und D. W. Tank (Jan. 1997). "In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons." In: *Nature* 385.6612, S. 161–165.
- Svoboda, K. und R. Yasuda (Juni 2006). "Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience." In: *Neuron* 50.6, S. 823–839.
- Tada, T. und M. Sheng (Feb. 2006). "Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis." In: *Curr Opin Neurobiol* 16.1, S. 95–101.
- Takano, T., G.-F. Tian, W. Peng u. a. (Juni 2007). "Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia." In: *Nat Neurosci* 10.6, S. 754–762.
- Tamura, Y., K. Hamajima, K. Matsui u. a. (Nov. 2005). "The F(ab)'₂ fragment of an A β -specific monoclonal antibody reduces A β deposits in the brain." In: *Neurobiol Dis* 20.2, S. 541–549.
- Tanaka, S., S. Nakamura, K. Ueda u. a. (Dez. 1988). "Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease." In: *Biochem Biophys Res Commun* 157.2, S. 472–479.
- Tanaka, S., S. Shiojiri, Y. Takahashi u. a. (Dez. 1989). "Tissue-specific expression of three types of β -protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain." In: *Biochem Biophys Res Commun* 165.3, S. 1406–1414.
- Tang, Y. P., E. Shimizu, G. R. Dube u. a. (Sep. 1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." In: *Nature* 401.6748, S. 63–69.
- Tang, Y. P., H. Wang, R. Feng, M. Kyin und J. Z. Tsien (Nov. 2001). "Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice." In: *Neuropharmacology* 41.6, S. 779–790.

- Tang, Y., J. R. Nyengaard, D. M. De Groot und H. J. Gundersen (Sep. 2001). "Total regional and global number of synapses in the human brain neocortex." In: *Synapse* 41.3, S. 258–273.
- Tanzi, R. E. (2012). "The genetics of Alzheimer disease." In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.10, a006296.
- Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins u. a. (Feb. 1987). "Amyloid β protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." In: *Science* 235.4791, S. 880–884.
- Tarawneh, R. und D. M. Holtzman (Mai 2012). "The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment." In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.5, a006148.
- Teplow, D. B. (Juni 1998). "Structural and kinetic features of amyloid β -protein fibrillogenesis." In: *Amyloid* 5.2, S. 121–142.
- Terry, R. D. (1994). "Neuropathological changes in Alzheimer disease." In: *Prog Brain Res* 101, S. 383–390.
- Terry, R. D., E. Masliah, D. P. Salmon u. a. (Okt. 1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." In: *Ann Neurol* 30.4, S. 572–580.
- Terzi, E., G. Hölzemann und J. Seelig (Okt. 1995). "Self-association of β -amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes." In: *J Mol Biol* 252.5, S. 633–642.
- (Dez. 1997). "Interaction of Alzheimer β -amyloid peptide(1-40) with lipid membranes." In: *Biochemistry* 36.48, S. 14845–14852.
- Thal, D. R. und H. Braak (Mai 2005). "Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease." In: *Pathologie* 26.3, S. 201–213.
- Thal, D. R., E. Capetillo-Zarate, K. Del Tredici und H. Braak (März 2006). "The development of amyloid β protein deposits in the aged brain." In: *Sci Aging Knowledge Environ* 2006.6, re1.
- Thal, D. R., U. Rüb, M. Orantes und H. Braak (Juni 2002). "Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD." In: *Neurology* 58.12, S. 1791–1800.
- Thiel, G. (Jan. 1993). "Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles." In: *Brain Pathol* 3.1, S. 87–95.

- Trachtenberg, J. T., B. E. Chen, G. W. Knott u. a. (2002). “Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex.” In: *Nature* 420.6917, S. 788–794.
- Trojanowski, J. Q. und V. M. Lee (2000). “„Fatal attractions“ of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders.” In: *Ann N Y Acad Sci* 924, S. 62–67.
- Tsai, J., J. Grutzendler, K. Duff und W.-B. Gan (Nov. 2004). “Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches.” In: *Nat Neurosci* 7.11, S. 1181–1183.
- Turner, P. R., K. O’Connor, W. P. Tate und W. C. Abraham (Mai 2003). “Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory.” In: *Prog Neurobiol* 70.1, S. 1–32.
- Valenzuela, M. J. und P. Sachdev (Aug. 2006). “Brain reserve and cognitive decline: a non-parametric systematic review.” In: *Psychol Med* 36.8, S. 1065–1073.
- Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan u. a. (Okt. 1999). “ β -secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE.” In: *Science* 286.5440, S. 735–741.
- Villain, N., G. Ch  telat, B. Grassiot u. a. (Juli 2012). “Regional dynamics of amyloid- β deposition in healthy elderly, mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease: a voxelwise PiB-PET longitudinal study.” In: *Brain* 135.Pt 7, S. 2126–2139.
- Villemagne, V. L., K. E. Pike, G. Ch  telat u. a. (Jan. 2011). “Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease.” In: *Ann Neurol* 69.1, S. 181–192.
- Vinters, H. V., Z. Z. Wang und D. L. Secor (Apr. 1996). “Brain parenchymal and microvascular amyloid in Alzheimer’s disease.” In: *Brain Pathol* 6.2, S. 179–195.
- Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, M. J. Rowan und D. J. Selkoe (Aug. 2002). “Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition.” In: *Biochem Soc Trans* 30.4, S. 552–557.
- Walsh, D. M., A. Lomakin, G. B. Benedek, M. M. Condron und D. B. Teplow (Aug. 1997). “Amyloid β -protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate.” In: *J Biol Chem* 272.35, S. 22364–22372.
- Walsh, D. M. und D. J. Selkoe (Sep. 2004). “Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer’s disease.” In: *Neuron* 44.1, S. 181–193.

- Wang, A., P. Das, R. C. Switzer 3rd, T. E. Golde und J. L. Jankowsky (März 2011). “Robust amyloid clearance in a mouse model of Alzheimer’s disease provides novel insights into the mechanism of amyloid- β immunotherapy.” In: *J Neurosci* 31.11, S. 4124–4136.
- Wang, J., D. W. Dickson, J. Q. Trojanowski und V. M. Lee (Aug. 1999). “The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer’s disease from normal and pathologic aging.” In: *Exp Neurol* 158.2, S. 328–337.
- Wang, Z., B. Wang, L. Yang u. a. (Sep. 2009). “Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis.” In: *J Neurosci* 29.35, S. 10788–10801.
- Wasco, W., K. Bupp, M. Magendantz, J. F. Gusella, R. E. Tanzi und F. Solomon (Nov. 1992). “Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid β protein precursor.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89.22, S. 10758–10762.
- Wasco, W., S. Gurubhagavatula, M. D. Paradis u. a. (Sep. 1993). “Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer’s associated amyloid β protein precursor.” In: *Nat Genet* 5.1, S. 95–100.
- Weber, M., N. Scherf, T. Kahl u. a. (März 2013). “Quantitative analysis of astrogliosis in drug dependent humans.” In: *Brain Res* 1500, S. 72–87.
- Weiner, H. L., C. A. Lemere, R. Maron u. a. (Okt. 2000). “Nasal administration of amyloid- β peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer’s disease.” In: *Ann Neurol* 48.4, S. 567–579.
- Weintraub, S., A. H. Wicklund und D. P. Salmon (Apr. 2012). “The neuropsychological profile of Alzheimer disease.” In: *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.4, a006171.
- West, M. J. (Feb. 1999). “Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias.” In: *Trends Neurosci* 22.2, S. 51–61.
- (Aug. 2012). “Introduction to stereology.” In: *Cold Spring Harb Protoc* 2012.8, S. 843–851.
- Wetzel, R. (Sep. 2006). “Kinetics and thermodynamics of amyloid fibril assembly.” In: *Acc Chem Res* 39.9, S. 671–679.
- Whitehouse, P. J., D. L. Price, R. G. Struble, A. W. Clark, J. T. Coyle und M. R. Delon (März 1982). “Alzheimer’s disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain.” In: *Science* 215.4537, S. 1237–1239.

- Wilbrecht, L., A. Holtmaat, N. Wright, K. Fox und K. Svoboda (Apr. 2010). "Structural plasticity underlies experience-dependent functional plasticity of cortical circuits." In: *J Neurosci* 30.14, S. 4927–4932.
- Wilcock, D. M., A. Rojiani, A. Rosenthal u. a. (Juli 2004a). "Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition." In: *J Neurosci* 24.27, S. 6144–6151.
- Wilcock, D. M., A. Rojiani, A. Rosenthal u. a. (Dez. 2004b). "Passive immunotherapy against A β in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage." In: *J Neuroinflammation* 1.1, S. 24.
- Williams, R. W. und P. Rakic (Dez. 1988). "Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material." In: *J Comp Neurol* 278.3, S. 344–352.
- Winkler, F., Y. Kienast, M. Fuhrmann u. a. (Sep. 2009). "Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis." In: *Glia* 57.12, S. 1306–1315.
- Wischik, C. M., M. Novak, H. C. Thøgersen u. a. (Juni 1988). "Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85.12, S. 4506–4510.
- Wisniewski, K. E., H. M. Wisniewski und G. Y. Wen (März 1985). "Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome." In: *Ann Neurol* 17.3, S. 278–282.
- Wolfe, M. S. und S. Y. Guénette (Sep. 2007). "APP at a glance." In: *J Cell Sci* 120.Pt 18, S. 3157–3161.
- Xu, C. und W. R. Zipfel (2008). *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*. Hrsg. von B. R. Masters und P. So. 1st edition. Oxford University Press.
- Xu, H.-T., F. Pan, G. Yang und W.-B. Gan (Mai 2007). "Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex." In: *Nat Neurosci* 10.5, S. 549–551.
- Xu, T., X. Yu, A. J. Perlik u. a. (Dez. 2009). "Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories." In: *Nature* 462.7275, S. 915–919.
- Yamazaki, T., D. J. Selkoe und E. H. Koo (Apr. 1995). "Trafficking of cell surface β -amyloid precursor protein: retrograde and transcytotic transport in cultured neurons." In: *J Cell Biol* 129.2, S. 431–442.

- Yan, P., A. W. Bero, J. R. Cirrito u. a. (2009). “Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice.” In: *J Neurosci* 29.34, S. 10706–10714.
- Yan, R., M. J. Bienkowski, M. E. Shuck u. a. (Dez. 1999). “Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer’s disease β -secretase activity.” In: *Nature* 402.6761, S. 533–537.
- Yang, G., F. Pan und W.-B. Gan (Dez. 2009). “Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories.” In: *Nature* 462.7275, S. 920–924.
- Yang, G., F. Pan, C. N. Parkhurst, J. Grutzendler und W.-B. Gan (2010). “Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice.” In: *Nat Protoc* 5.2, S. 201–208.
- Yuste, R. (Dez. 2005). “Fluorescence microscopy today.” In: *Nat Methods* 2.12, S. 902–904.
- (2009). *Dendritic spines*. The MIT Press.
- (Sep. 2011). “Dendritic spines and distributed circuits.” In: *Neuron* 71.5, S. 772–781.
- Yuste, R. und T. Bonhoeffer (2001a). “Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity.” In: *Annu Rev Neurosci* 24, S. 1071–1089.
- Yuste, R. und A. Majewska (Okt. 2001b). “On the function of dendritic spines.” In: *Neuroscientist* 7.5, S. 387–395.
- Zheng, H. und E. H. Koo (2006). “The amyloid precursor protein: beyond amyloid.” In: *Mol Neurodegener* 1, S. 5.
- (2011). “Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein.” In: *Mol Neurodegener* 6.1, S. 27.
- Zhou, Q., K. J. Homma und M. Poo (Dez. 2004). “Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses.” In: *Neuron* 44.5, S. 749–757.
- Ziff, E. B. (Dez. 1997). “Enlightening the postsynaptic density.” In: *Neuron* 19.6, S. 1163–1174.
- Zipfel, W. R., R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman und W. W. Webb (Juni 2003a). “Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100.12, S. 7075–7080.

- Zipfel, W. R., R. M. Williams und W. W. Webb (Nov. 2003b). “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences.” In: *Nat Biotechnol* 21.11, S. 1369–1377.
- Zito, K., V. Scheuss, G. Knott, T. Hill und K. Svoboda (Jan. 2009). “Rapid functional maturation of nascent dendritic spines.” In: *Neuron* 61.2, S. 247–258.
- Zuo, Y., A. Lin, P. Chang und W.-B. Gan (Apr. 2005a). “Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex.” In: *Neuron* 46.2, S. 181–189.
- Zuo, Y., G. Yang, E. Kwon und W.-B. Gan (Juli 2005b). “Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex.” In: *Nature* 436.7048, S. 261–265.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
A β	Amyloid β (Spaltprodukt von APP)
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AICD	intrazelluläre Domäne von APP (APP intracellular domain)
AMPK	5' Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
AOM	akusto-optischer Modulator
APLP1/2	amyloid precursor like protein1/2
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein)
APP23	transgenes Alzheimer-Mausmodell
APPPS1	transgenes Alzheimer-Mausmodell
APPs α/β	lösliche Fragmente von APP nach Spaltung durch α/β -Sekretase
BACE	APP spaltendes Enzym (β -site APP cleaving enzyme)
c	Konzentration
CA1 Or	Stratum oriens der CA1 Region des Hippocampus
CA1 Rad	Stratum radiatum der CA1 Region des Hippocampus
CAA	zerebrale Amyloidangiopathie (cerebral amyloid angiopathy)
CAMKK2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2
CCR2	C-C Chemokinrezeptor Typ 2
CTF	Carboxy-terminales Fragment
CX ₃ CR1	Fraktalkin-Rezeptor1
d	Tag (day)
DG LMol	Stratum lacunosum-moleculare des Gyrus dentatus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	verbessertes (enhanced) grün fluoreszierendes Protein
eng.	englisch
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure (γ -aminobutyric acid)

GFAP	saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
<i>L</i>	Spine-Länge
LTD	Langzeitdepression (long-term depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (long-term potentiation)
NADH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
m	Anstieg einer Geraden
M	Molar
MAP-2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2 (microtubuli-associated protein-2)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
n.e.	neu entstandene
NICD	intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors (Notch intracellular domain)
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR2B	Untereinheit des NMDA-Rezeptors
OP	Operation
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAPP	transgenes Alzheimer-Mausmodell
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd

PiB	Pittsburgh compound B (Amyloid-bindendes Molekül)
PMT	Photomultiplier
PS	Präsenilin (1/2, katalytische Untereinheit der γ -Sekretase)
PSD-95	postsynaptische Dichte Protein 95 (postsynaptic density protein 95)
s	Sekunde
SAP	Synapsen-assoziierte Proteine (synapse-associated proteins)
SHG	second harmonic generation (nichtlinearer optischer Effekt)
tg	Transgen
Tg2576	transgenes Alzheimer-Mausmodell
Ti:Sa	Titan-dotierter Saphirkristall
U/min	Umdrehungen pro Minute
W_H	Durchmesser des Spine-Halses
W_K	Durchmesser des Spine-Kopfes
wt	Wildtyp
XFP	fluoreszierendes Protein mit variabler Farbe
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (yellow fluorescent protein)

Eigene Veröffentlichungen

Bittner T., **Burgold S.**, Dorostkar M. M., Fuhrmann M., Wegenast-Braun B. M., Schmidt B., Kretschmar H. und Herms J. (Dez. 2012) „Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss.“ *Acta Neuropathol* 124.6:797–807 (**geteilte Erstautorenschaft**)

Rominger A., Brendel M., **Burgold S.**, Keppler K., Baumann K., Xiong G., Mille E., Gildehaus F. J., Carlsen J., Schlichtinger J., Niedermoser S., Wängler B., Cumming P., Steiner H., Herms J., Haass C., Bartenstein P. (Mai 2013) „Longitudinal assessment of cerebral β -amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant β -amyloid precursor protein using 18F-Florbetaben PET.“ *J Nucl Med* Epub ahead of print

Boländer A., Kieser D., Voss C., Bauer S., Schön C., **Burgold S.**, Bittner T., Hölzer J., Heyny-von Haußen R., Mall G., Goetschy V., Czech C., Knust H., Berger R., Herms J., Hilger I. und Schmidt B. (Nov. 2012) „Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines, and pyridazines as imaging agents for tau fibrils and β -amyloid plaques in Alzheimer’s disease models.“ *J Med Chem* 55.21:9170–80

Schön C., Hoffmann N. A., Ochs S. M., **Burgold S.**, Filser S., Steinbach S., Seeliger M. W., Arzberger T., Goedert M., Kretschmar H. A., Schmidt B. und Herms J. (Dez. 2012) „Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice.“ *PLoS One* 7.12:e53547

Burgold S., Bittner T., Dorostkar M. M., Kieser D., Fuhrmann M., Mitteregger G., Kretschmar H., Schmidt B. und Herms J. (März 2011) „In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of new born amyloid plaques over weeks.“ *Acta Neuropathol* 121.3:327–35

Von Baumgarten L., Brucker D., Tirniceru A., Kienast Y., Grau S., **Burgold S.**, Herms J. und Winkler F. (Okt. 2011) „Bevacizumab has differential and dose-dependent effects on glioma blood vessels and tumor cells.“ *Clin Cancer Res* 17.19:6192–205

Bittner T., Fuhrmann M., **Burgold S.**, Ochs S. M., Hoffmann N., Mitteregger G., Kretzschmar H., LaFerla F. M. und Herms J. (Nov. 2011) „Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer’s disease mice.“ *PLoS One* 5.11:e15477

Fuhrmann M., Bittner T., Jung C. K., **Burgold S.**, Page R. M., Mitteregger G., Haass C., LaFerla F. M., Kretzschmar H. und Herms J. (Apr. 2010) „Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer’s disease.“ *Nat Neurosci* 13.4:411–3

Winkler F., Kienast Y., Fuhrmann M., Von Baumgarten L., **Burgold S.**, Mitteregger G., Kretzschmar H. und Herms J. (Sep. 2009) „Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis.“ *Glia* 57.12:1306–15

Bittner T., Fuhrmann M., **Burgold S.**, Jung C. K., Volbracht C., Steiner H., Mitteregger G., Kretzschmar H. A., Haass C. und Herms J. (Aug. 2009) „ γ -secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway.“ *J Neurosci* 29.33:10405–9

Tannert A., Tannert S., **Burgold S.** und Schaefer M. (Jun. 2009) „Convolution-based one and two component FRAP analysis: theory and application.“ *Eur Biophys J* 38.5:649–61

Tannert A., Voigt P., **Burgold S.**, Tannert S. und Schaefer M. (Okt. 2008) „Signal amplification between $G\beta\gamma$ release and PI3K γ -mediated PI(3,4,5)P3 formation monitored by a fluorescent $G\beta\gamma$ biosensor protein and repetitive two component total internal reflection/fluorescence redistribution after photobleaching analysis.“ *Biochemistry* 47.43:11239–50

Manuskripte in Vorbereitung

Burgold S., Filser S., Dorostkar M. M., Schmidt B. und Herms J. „Observing the complete Alzheimer’s plaque growth kinetics in vivo reveals a sigmoid-shaped curve.“

Dorostkar M. M., **Burgold S.**, Filser S., Ebert U., Hillen H., Barghorn S., Klein C. und Herms J. „Plaque-associated synaptic pathology is alleviated by anti-amyloidogenic immunotherapy in a mouse of Alzheimer’s disease.“ (**geteilte Erstautorenschaft**)

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Jochen Herms für das interessante Thema, das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die Unterstützung herzlich bedanken. Dadurch hatte ich die Möglichkeit in einem ausgezeichneten wissenschaftlichen Umfeld zu arbeiten, was unabdingbar für das Gelingen der Doktorarbeit war.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Rainer Uhl für die gute Zusammenarbeit und die Bereitschaft die externe Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie zu vertreten.

Bei Prof. Dr. Dr. Hans Kretzschmar, Institutsleiter des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, möchte ich mich für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Arbeitsmitteln bedanken.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit hatte ich die Möglichkeit mit vielen Wissenschaftlern zusammenzuarbeiten, Gedanken auszutauschen und zu lernen. Hierbei möchte ich die Kollaboration mit Abbott hervorheben und Prof. Dr. Ulrich Ebert, Dr. Heinz Hillen, Dr. Corinna Klein, Dr. Stefan Barghorn, Dr. Elizabeth Van Der Kam und Bodo Janson danken. Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Boris Schmidt für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Für ein sehr gutes Arbeitsklima möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Kollegen der AG Herms danken. Besonders hervorheben möchte ich Christian und Kevin, da uns mehr als die Arbeit verbindet. Ein großes Dankeschön geht an Sonja, Caro, Olga und die Kollegen vom Tierstall für euren Einsatz und eure Hilfe. Martin und Tobi danke ich für eine sehr gute Einführung in die *in vivo* Mikroskopie und Manu für die vielen Diskussionen. Auch meinen Freunden und allen anderen Kollegen aus dem ZNP sei ein Dank ausgesprochen, für ihre Unterstützung und/oder angenehme Gespräche in den Pausen, die den Laboralltag erleichterten.

An meine Eltern richtet sich ein besonders großes und liebes Dankeschön. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.

Zum Schluß, aber nicht zuletzt, ein ebenfalls besonders liebes Dankeschön an meine Hanna.