

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. P. Bartenstein

**Monitoring einer chronischen Behandlung mit einem γ -
Sekretase-Modulator mittels Amyloid-PET im transgenen
Alzheimer-Mausmodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christina Rötzer
aus
Deggendorf

Jahr
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Axel Rominger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Oliver Pogarell
PD Dr. med. Frank Wollenweber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.med. Matthias Brendel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1 Morbus Alzheimer	8
1.1.1 Demenz als Volkskrankheit zur Zeit des demographischen Wandels.....	8
1.1.2 Charakteristika im Vergleich zu anderen Demenzformen	9
1.1.3 Histopathologische Veränderungen im Gehirn.....	10
1.1.3.1 Extrazelluläre Plaques aus A β	11
1.1.3.2 Intrazelluläre Fibrillen aus hyperphosphoryliertem Tau.....	12
1.1.3.3 Inflammation durch NF- κ B	12
1.1.3.4 Synaptische Dysfunktion und Atrophie.....	13
1.1.4 Risikofaktoren.....	13
1.1.4.1 Alter	13
1.1.4.2 Apolipoprotein E4-Status	14
1.1.4.3 Weitere Risikofaktoren.....	14
1.2 Die Rolle der PET in der Demenzbildung.....	15
1.2.1 Positronenemissionstomographie (PET)	15
1.2.1.1 Allgemeine Funktionsweise.....	15
1.2.1.2 Kleintier-PET	15
1.2.2 Radiopharmaka	16
1.2.2.1 Amyloid-PET	16
1.2.2.1.1 Pittsburgh Compound B ([¹¹ C]-PIB)	16
1.2.2.1.2 [¹⁸ F]-Florbetaben	17
1.2.2.1.3 Weitere Amyloid-PET-Tracer.....	18
1.2.2.2 FDG-PET	19
1.2.2.3 Weitere Tracer.....	19
1.2.3 Therapiemonitoring an Hand von longitudinalen PET-Studien.....	20
1.3 Verschiedene transgene Mausmodelle.....	21
1.3.1 APP-Mutationen	21
1.3.2 Presenilin 1- und 2-Mutationen	22
1.4 Therapiemöglichkeiten.....	23
1.4.1 Etablierte Therapien.....	23
1.4.1.1 Acetylcholinesterase-Hemmer	23
1.4.1.2 Memantin	24

1.4.2 Weitere Therapieansätze	24
1.4.3 Neue medikamentöse Therapieansätze.....	25
1.4.3.1 GSI vs. GSM.....	25
1.4.3.2 BACE-Inhibitoren	27
1.4.3.3 Immunisierung.....	27
1.5 Ziel der Arbeit	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Studiendesign	29
2.1.1 Therapiesubstanz RO5506284 und Applikation	29
2.1.2 Charakteristika der Studie	31
2.1.3 Micro-PET-Scanner	32
2.1.4 Ablauf der μ PET-Scans.....	33
2.2 Transgenes Tiermodell	34
2.3 Radiosynthese von [18 F]-Florbetaben.....	35
2.4 Datenakquisition und Bildrekonstruktion	36
2.5 PET-Datenanalyse.....	37
2.5.1 VOI-basierte Auswertung	37
2.5.2 PVEC (Partialvolumeneffekt-Korrektur)	37
2.6 Histopathologische Untersuchungen	38
2.7 Biochemische Untersuchungen.....	39
2.8 Statistik.....	40
3. Ergebnisse.....	40
3.1 Basischarakteristika und Entwicklung der Tierpopulation	40
3.2 Ergebnisse der μ PET-Scans.....	42
3.2.1 Visuelle Interpretation	42
3.2.2 Semiquantitative Analyse der transgenen Tiere	43
3.2.2.1. Verlauf der Einzelgruppen.....	43
3.2.2.2 Vergleich der GSM- und Vehikel-Gruppe	44
3.2.2.3 Exemplarische Betrachtung von Einzeltieren.....	46
3.2.2.4 Prädiktion von Baseline auf prozentualen Anstieg	48
3.2.3 Semiquantitative Analyse der Wildtyptiere	49
3.2.3.1 Verlauf der Einzelgruppen.....	49
3.2.3.2 Vergleich der GSM und Vehikel Gruppe.....	50
3.3 Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen.....	50
3.4 Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen	54

3.4.1 Lösliches Amyloid	54
3.4.2 Unlösliches Amyloid	55
3.5 Zusammenschau der Modalitäten	58
3.5.1 Korrelation zwischen PET und Histopathologie	58
3.5.2 Korrelation zwischen PET und Biochemie	59
3.5.3 Korrelation zwischen Biochemie und Histopathologie	60
4. Diskussion.....	62
4.1 Interindividuelle Unterschiede/Varianz der AD-Mausmodelle.....	62
4.2. Therapieerfolg anhand von PET-Ergebnissen.....	64
4.2.1 Diskussion der generierten PET-Daten.....	64
4.2.2 Diskussion der Maus-PET-Daten im Kontext von klinischen Studien.....	66
4.3 Therapieerfolg anhand von Histodaten	68
4.3.1 Auswirkung der GSM Therapie auf Plaqueload, -dichte und -größe.....	68
4.3.2 Gegenüberstellung der verschiedenen histologischen Färbungen.....	70
4.4 Diskussion der biochemischen A β -Peptidverteilung.....	71
4.4.1 Auswirkung der GSM-Therapie auf A β 42 als amyloidogenen Faktor	71
4.4.2 Korrelation der Biochemie mit PET und Histopathologie	73
4.5 Ausblick.....	74
5. Zusammenfassung.....	75
6. Summary.....	77
7. Literaturverzeichnis.....	80
8. Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

A β : Beta-Amyloid

AD: Alzheimer-Demenz

APP: Amyloid-Precursor-Protein

BL: Baseline-Scan

FU1: erster Follow-up-Scan

FU2: zweiter Follow-up-Scan = finaler Scan = Endpunkt Scan

GSI: Gamma-Sekretase-Inhibitor

GSM: Gamma-Sekretase-Modulator

MCI: Mild cognitive impairment

μ PET: Micro-PET

NSAIDs: Nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente

PET: Positronenemissionstomographie

PS: Presenilin

PVE: Partialvolumeneffekte

PVEC: Partialvolumeneffekt-Korrektur

SUVR: Standardized-uptake-value-ratio

TG-GSM: Transgene Mäuse, mit γ -Sekretase-Modulator RO5506284 therapiert

TG-VEH: Transgene Mäuse, mit Vehikel-Substanz (Placebo) therapiert

VOI: Volume of interest

WT-GSM: Wildtypiere, mit γ -Sekretase-Modulator RO5506284 therapiert

WT-VEH: Wildtypiere, mit Vehikel-Substanz (Placebo) therapiert

1. Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

Im Jahr 1906 beschrieb der Psychiater Alois Alzheimer bei seiner Patientin Auguste Deter ein Krankheitsbild, welches heute als Morbus Alzheimer bekannt ist. Die Patientin litt unter progredientem Gedächtnisverlust und Verhaltensauffälligkeiten, wodurch sie ihr bisheriges Leben zu Hause nicht fortführen konnte. Bei der Untersuchung ihres Gehirns stellte Alois Alzheimer eine Großhirnatrophie mit erheblichem Neuronenuntergang fest (Cipriani, Dolciotti et al. 2011). Gemäß der ICD-Definition handelt es sich bei der Alzheimer-Demenz um eine „primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam, aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren.“ (ICD-10, Kap. V(F), 6. Auflage, 2008)

1.1.1 Demenz als Volkskrankheit zur Zeit des demographischen Wandels

Zurzeit leben in Deutschland etwa 1,2 bis 1,4 Millionen Menschen mit Demenz, wobei 50 bis 60 % auf die Alzheimer-Demenz (AD) verfallen. Pro Jahr werden ca. 100.000 Neuerkrankungen registriert. 2010 war weltweit bei ca. 35 Millionen Menschen AD diagnostiziert. Binnen 20 Jahren ist annähernd mit einer Verdoppelung dieser Zahl zu rechnen, sodass bis 2050 in etwa 115 Millionen Menschen weltweit betroffen sein könnten. Demenz ist in den Industrienationen die vierthäufigste Todesursache, wobei die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung noch sieben Jahre beträgt (Tricco, Vandervaart et al. 2012). Die Demenzerkrankung ist also lebensverkürzend und stellt unter Berücksichtigung der demographischen Entwicklung Deutschlands (s. Abbildung 1), in welcher der ältere

Bevölkerungsanteil am stärksten zunimmt, eine erhebliche finanzielle Belastung des Gesundheitssystems dar, da Demenzpatienten intensive medizinische und pflegerische Betreuung benötigen (Ziegler-Graham, Brookmeyer et al. 2008).

Anteil der jeweiligen Altersjahre in Prozent der Gesamtbevölkerung

Datengrundlage: Statistisches Bundesamt

Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung



Abbildung 1: Extrapolation der demographischen Entwicklung Deutschland bis 2050: Zunahme der älteren Bevölkerung und Entwicklung der Bevölkerungspyramide zu einem Bevölkerungspilz (<http://www.berlin-institut.org/online-handbuchdemografie/bevoelkerungsdynamik/auswirkungen/alterung.html>)

1.1.2 Charakteristika im Vergleich zu anderen Demenzformen

Der Morbus Alzheimer ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, welche sich vor allem nach dem 65. Lebensjahr manifestiert. 95 % der Erkrankungsfälle treten sporadisch auf und sind mit zahlreichen Risikofaktoren assoziiert (näheres hierzu s. Kap. 1.1.4). Ca. 5 % jedoch sind familiär durch Mutationen im Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Gen oder Presenilin 1- bzw. Presenilin 2-Gen (näheres hierzu s. Kap. 1.1.3.1) bedingt und können sich auch schon zwischen der dritten und fünften

Lebensdekade manifestieren. Die familiäre Form folgt einem autosomal-dominanten Erbgang. Die Alzheimer-Krankheit ist vor allem gekennzeichnet durch progredienten Gedächtnisverlust, Verwirrung, eingeschränktes Urteilsvermögen, Verlust der kognitiven Fähigkeiten, Verhaltensauffälligkeiten, Schwierigkeiten, sich adäquat zu artikulieren, und Wesensänderung mit erheblicher Einschränkung des täglichen Lebens (Sun, Jin et al. 2012). Laut S3-Leitlinie, welche sich auf die IWG-2-Kriterien stützt (Dubois, Feldman et al. 2014), müssen diese Symptome für mindestens sechs Monate bestehen. Die zweithäufigste Demenzform ist die vaskuläre Demenz, welche sich durch kognitive Defizite und fokale neurologische Symptome äußert und nach zerebralen mikro- oder makrovaskulären Ereignissen auftritt (Roman, Tatemichi et al. 1993). Bei der Lewykörper-Demenz treten Fluktuationen der Aufmerksamkeit und Wachheit, visuelle Halluzinationen und Parkinson-Symptome auf. Zu Beginn der Erkrankung bestehen häufig nur geringe Einschränkungen der Gedächtnisfunktion (McKeith, Dickson et al. 2005). Die frontotemporale Demenz ist durch Verhaltensdefizite und Persönlichkeitsveränderungen im Rahmen einer im Krankheitsverlauf frühen frontalen Enthemmung gekennzeichnet (Rascovsky, Hodges et al. 2011). Alle (genannten) Demenzformen gehen mit einer Beeinträchtigung der Alltagsaktivitäten einher.

1.1.3 Histopathologische Veränderungen im Gehirn

Bereits Alois Alzheimer konnte 1906 in der lichtmikroskopischen Untersuchung des Gehirns von Auguste Deter extrazelluläre Eiweißablagerungen feststellen, nämlich Plaques aus aggregierten Beta-Amyloid-Peptiden ($A\beta$ -Peptiden). Ein weiteres histopathologisches Charakteristikum der Alzheimer-Demenz sind intrazelluläre neurofibrilläre Bündel aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen (Braak and Braak 1997, Duyckaerts, Delatour et al. 2009).

1.1.3.1 Extrazelluläre Plaques aus A β

Die extrazellulär gelegenen Plaques bestehen vor allem aus verschiedenen A β -Peptiden, zu einem Großteil aus A β 42, welches im Vergleich zu den kürzeren A β -Peptiden die Bildung von Amyloidplaques begünstigt (Karran, Mercken et al. 2011). Die verschieden langen A β -Peptide 1 bis 42 entstehen durch Abspaltung aus dem APP durch die Enzyme β -Sekretase und anschließend γ -Sekretase. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2. Beim APP handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein aus 695, 751 oder 770 Aminosäuren, welches als Membranrezeptor fungiert und auf dem Chromosom 21 kodiert ist (Sun, Jin et al. 2012), wodurch sich auch die Koinzidenz der Alzheimer-Krankheit mit der Trisomie 21 erklären lässt. Die β -Sekretase (= BACE1 = β -site APP cleaving enzyme) spaltet APP in ein membrangebundenes C-terminales Fragment (CTF = C99) und in lösliches APP (sAPP β), welches daraufhin durch die γ -Sekretase zu A β 1 bis 42 und in APP intracellular domain (AICD) prozessiert wird (LaFerla, Green et al. 2007). A β 1 bis 42 wird nach extrazellulär sezerniert und AICD nach intrazellulär. Am häufigsten wird A β 40 gebildet. Der Anteil an A β 42 beträgt nur 5 bis 10 %. Der γ -Sekretase-Komplex besteht aus vier Untereinheiten, nämlich aus Presenilin 1 oder 2, Nicastrin, Anterior-pharynx-defective protein 1 (APH-1) und Presenilin enhancer 2 (PEN2). Das entstandene A β -Peptid besitzt die Fähigkeit zur Oligomerisierung und bildet dadurch Plaques, wobei eine Umfaltung von einer α -helikalen Struktur zu einer β -Faltblattstruktur erfolgt (Sun, Jin et al. 2012). Alternativ zu dem beschriebenen amyloidogenen Weg kann das APP anstatt durch die β -Sekretase durch eine α -Sekretase (TACE, ADAM10) in lösliches APP α und ein intramembranäres C-terminales Fragment (C83) gespalten werden, wodurch eine A β -Bildung ausgeschlossen ist, da die Spaltung innerhalb der A β -Region, welche in Abbildung 2 rechts rot dargestellt ist, erfolgt. Das in der Zellmembran verbliebene C83-Fragment

wird durch die γ -Sekretase in eine AICD (wie beim amyloidogenen Weg) und ein p3-Fragment, welches nach extrazellulär sezerniert wird, gespalten (LaFerla, Green et al. 2007).

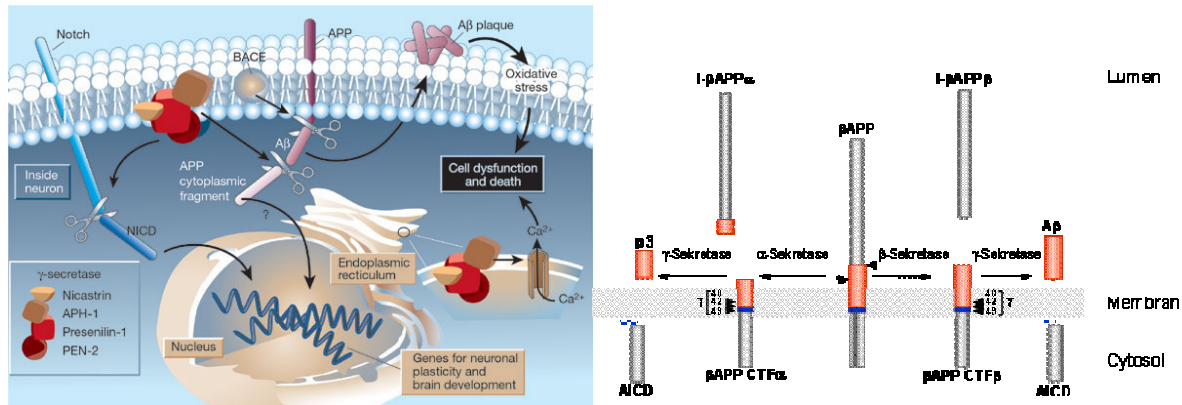


Abbildung 2: APP-Prozessierung

links: amyloidogener und nicht amyloidogener Weg
(biowiki.ucdavis.edu/Biochemistry/Catalysis/Enzymatic_Mechanisms/Proteases_Mechanisms)

rechts: amyloidogener Weg (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/capell-anja-2005-07-05/HTML/chapter1.html>)

1.1.3.2 Intrazelluläre Fibrillen aus hyperphosphoryliertem Tau

Das Protein Tau gehört zur Gruppe der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs), welche zur Mikrotubulistabilisierung in den Nervenzellen dienen. Durch eine Hyperphosphorylierung, welche entweder spontan oder durch A β 42 induziert (Hardy, Duff et al. 1998) auftritt, verliert Tau seine Bindungsfähigkeit an die Mikrotubuli und somit seine stabilisierende Funktion für diese. Die hyperphosphorylierten Tau-Proteine lagern sich intrazellulär zu paarigen helikalen Filamenten (PHF) zusammen und werden als neurofibrilläre Bündel sichtbar.

1.1.3.3 Inflammation durch NF- κ B

Die Alzheimer-Demenz geht auch mit einer Entzündungsreaktion einher, welche sich durch Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia äußert und welche durch die proinflammatorisch wirkenden Amyloidplaques im Gehirn verursacht wird (Akiyama,

Barger et al. 2000, Rojas, Herance et al. 2013). A β , vor allem A β 42, induziert die Gliazellen und regt diese über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Bildung von Zytokinen, wie z.B. Interleukin 1, 2 und 6, sowie von neurotoxischen freien Radikalen an (Akama, Albanese et al. 1998).

1.1.3.4 Synaptische Dysfunktion und Atrophie

Die oben beschriebenen extrazellulären Amyloidplaques, die intrazellulären Tau-Fibrillen, die Entzündungsreaktion sowie eine mitochondriale Fehlfunktion und ein verminderter Glukosemetabolismus (näheres hierzu s. Kap. 1.2.2.2) führen zu einer synaptischen Fehlfunktion und daraus resultierend zu einer Gehirnatrophie, welche sowohl in bildgebenden Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) als auch *post mortem* festgestellt werden kann. Bei seit zwei bis vier Jahren klinisch auffälligen Alzheimer-Patienten konnte im frontalen und parietalen Kortex eine im Vergleich zu gesunden Individuen 25- bis 35-prozentige Abnahme der Synapsenanzahl festgestellt werden (Davies, Mann et al. 1987). Ein Neuronenuntergang resultiert aus der Dysfunktion und Abnahme an Synapsen (Selkoe 2002), welcher wiederum eine Gehirnatrophie bedingt.

1.1.4 Risikofaktoren

Bei der sporadischen Alzheimer-Demenz gibt es zahlreiche Risikofaktoren, welche deren Entstehung begünstigen.

1.1.4.1 Alter

Den bedeutendsten Risikofaktor der sporadischen AD stellt das zunehmende Alter dar, mit welchem exponentiell die Prävalenz der Erkrankung steigt. Somit sind ca. 10 % der über 65-Jährigen betroffen und fast 50 % der über 85-Jährigen (Sun, Jin et al. 2012). Auf Grund der demographischen Alterung (s. Kap. 1.1.1) kommt dem Morbus

Alzheimer eine immer größere medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung zu. Über den physiologischen Hirnalterungsprozess hinausgehend kommt es zum Neuronenverlust mit Synapsenuntergang und zu einer Großhirnatrophie.

1.1.4.2 Apolipoprotein E4-Status

Das Apolipoprotein E (Apo E) ist ein Strukturprotein des Lipoproteins HDL und der Chylomikrone. Es vermittelt die Endozytose der Chylomikron-Remnants und der Cholesterinester der HDL in die Leber (Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage, S. 244). Zusätzlich zur Bildung in Leber und Darm wird das Apo E von Astrozyten im Gehirn sezerniert, welches am Transport des ausschließlich im Gehirn synthetisierten Cholesterins an seinen Bestimmungsort wesentlich beteiligt ist. Zudem bindet Apo E an β -Amyloid und befindet sich auch in den Amyloidplaques. Es gibt drei Allele, nämlich Apo E2, E3 und E4, wobei das Risiko, an AD zu erkranken, bei einer Homozygotie von Apo E4 am deutlichsten erhöht ist. Ca. 2 % der Bevölkerung sind homozygote Träger von Apo E4. Träger des Allels Apo E2 haben ein vergleichsweise geringeres Risiko, an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken (Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage, S. 790).

1.1.4.3 Weitere Risikofaktoren

In einer sechs Jahre dauernden prospektiven Studie mit insgesamt 5607 Probanden konnte gezeigt werden, dass eine lang andauernde depressive Störung mit einem signifikant erhöhten Risiko für eine dementielle Erkrankung einhergeht (Steenland, Karnes et al. 2012). Des Weiteren stellen kardiovaskuläre Erkrankungen wie z.B. die arterielle Hypertonie einen wichtigen Risikofaktor dar, wobei bei ca. 10 bis 15 % der an Demenz Erkrankten eine Komorbidität zwischen einer Alzheimer-Demenz und einer vaskulären Demenz vorliegt. Der Diabetes mellitus Typ 2 bedingt durch die Insulinresistenz, welche in der Phosphorylierung der β -Amyloide und Tau-Proteine

eine Rolle spielt, einen wichtigen epidemiologischen Zusammenhang zur AD (Li, Song et al. 2015). Ein erhöhtes Risiko besteht zudem bei Personen mit einem niedrigen Bildungsniveau sowie einer geringen psychosozialen Interaktion. Es ist nicht sicher belegbar, ob das weibliche Geschlecht ebenfalls einen Risikofaktor darstellt (Prencipe, Casini et al. 1996).

1.2 Die Rolle der PET in der Demenzbildung

1.2.1 Positronenemissionstomographie (PET)

1.2.1.1 Allgemeine Funktionsweise

Die verwendeten Radionuklide emittieren im Rahmen eines β^+ -Zerfalls Positronen, welche beim Zusammentreffen mit einem Elektron vernichtet werden (Annihilationsstrahlung). Die entstehenden Photonen (= γ -Quanten) besitzen eine Energie von 511 keV und entfernen sich in einem Winkel von 180° voneinander. Durch das Auftreffen von zwei gegenüberliegenden γ -Quanten auf einem, um den Patienten befindlichen, Detektorring wird die Verteilung des Radiopharmakons im Körper berechnet. Das ermittelte Aktivitätsverteilungsmuster wird in sagittaler, axialer und koronarer Ebene rekonstruiert.

1.2.1.2 Kleintier-PET

Es wurden spezielle Kleintier-PET-Scanner entwickelt, um eine hohe Ortsauflösung auch bei kleinen Strukturen sicherzustellen und die Durchführung longitudinaler tierexperimenteller Studien zum Beispiel in der präklinischen Medikamententestung zu erleichtern. Micro-PET-Scanner erweitern die Vielfalt der Einsatzgebiete der präklinischen Forschung in der Onkologie, Kardiologie und Neurologie und ermöglichen eine präklinische Validierung neuer PET-Tracer.

1.2.2 Radiopharmaka

1.2.2.1 Amyloid-PET

Sowohl an intrazelluläre Tau-Fibrillen als auch an extrazelluläre β -Amyloide binden verschiedene intravenös applizierte, mit einem Radionuklid (z.B. $[^{18}\text{F}]$) markierte Radiopharmaka (= Tracer), wodurch Aussagen über den Krankheitsprogress sowohl von an AD erkrankten Patienten als auch von Versuchstieren getroffen werden können. Die für die Detektion von Amyloid am häufigsten verwendeten Radionuklide sind $[^{11}\text{C}]$ und $[^{18}\text{F}]$, wobei Radiopharmaka mit dem radioaktiven Isotop $[^{18}\text{F}]$ wegen der deutlich längeren Halbwertszeit von 109,77 Minuten gegenüber dem radioaktiven Isotop $[^{11}\text{C}]$ mit einer Halbwertszeit von 20,3 Minuten bevorzugt werden. Der häufigste Tracer mit dem Nuklid $[^{11}\text{C}]$ ist $[^{11}\text{C}]$ -PIB (= Pittsburgh Compound B). Beispiele für Radiopharmaka mit dem Radionuklid $[^{18}\text{F}]$ sind $[^{18}\text{F}]$ -Florbetaben (Barthel, Luthardt et al. 2011), $[^{18}\text{F}]$ -Florbetapir (Poisnel, Dhilly et al. 2012) und $[^{18}\text{F}]$ -Flutemetamol (Snellman, Rokka et al. 2014).

1.2.2.1.1 Pittsburgh Compound B ($[^{11}\text{C}]$ -PIB)

$[^{11}\text{C}]$ -PIB ist der Goldstandard unter den Amyloid-Tracern. Klunk et al. zeigten 2004 erstmals eine vermehrte Traceraufnahme im Gehirn von AD-Patienten, welche mit der in der Autopsie bestimmten Amyloidmenge eng korrelierte (Klunk, Engler et al. 2004). Mausstudien verhalten sich dazu uneinheitlich. Klunk et al. konnten 2005 keinen signifikanten Unterschied in der Aufnahme von $[^{11}\text{C}]$ -PIB im Gehirn von sechs bis zwölf Monate alten doppelt transgenen PS1/APP-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen PS1-Kontrolltieren feststellen (Klunk, Lopresti et al. 2005). Ebenso wenig konnte die Gruppe von Toyama einen signifikanten Unterschied in der Aufnahme von Pittsburgh Compound B bei 22 Monate alten Tg2576-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypieren ermitteln (Toyama, Ye et al. 2005). Als

Grund für den „Misserfolg“ wurde eine geringere Dichte der hoch affinen Bindungsstellen für A β bei transgenen Mäusen im Vergleich zu Menschen angegeben. 2007 gelang es jedoch Maeda et al., bei APP23-Mäusen mit der Schwedischen Doppelmutation im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyptieren eine Kortex/Cerebellum-Ratio von 1,5 im Vergleich zu 1,0 bei den Kontrolltieren und eine Hippocampus/Cerebellum-Ratio von 1,5 im Vergleich zu 1,05 bei den Wildtyptieren zur Minute 40 bei einer dynamischen Scandauer von 60 Minuten festzustellen (Maeda, Ji et al. 2007). Im Unterschied zu Klunk und Toyama verwendete die Forschungsgruppe Maeda eine viel höhere spezifische Aktivität, nämlich > 200 GBq/ μ mol zum Injektionszeitpunkt. Bei Klunk und Toyama betrug diese zwischen 37 und 118 GBq/ μ mol. Außerdem verwendeten Klunk et al. jüngere Tiere als Maeda. Von großer Bedeutung ist auch die Wahl des transgenen Mausstamms: Klunk verwendete APP/PS1-Mäuse, Toyama Tg2576-Mäuse. Maeda hingegen verwendete ebenso wie Snellman APP23-Mäuse. Auch Snellman konnte trotz einer geringeren spezifischen Aktivität von 100 GBq/ μ mol eine signifikante Zunahme der Kortex/Cerebellum-Ratio mit zunehmendem Alter im [11 C]-PIB-PET feststellen (Snellman, Lopez-Picon et al. 2013).

1.2.2.1.2 [18 F]-Florbetaben

Bei [18 F]-Florbetaben handelt es sich um ein relativ neues Radiopharmakon, welches im März 2013 von der amerikanischen und europäischen Arzneimittelzulassungsbehörde auf Antrag von Piramal Imaging SA hin zum Amyloid-Imaging mittels PET zugelassen wurde. [18 F]-Florbetaben zeigt eine selektive Traceraufnahme im gesamten Neokortex bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen und statistisch signifikant höhere Standardized-uptake-value-ratio-Werte (SUVR-Werte) für den frontalen, lateralen, temporalen, parietalen, okzipitalen sowie

anterioren und posterioren cingulären Kortex bei AD-Patienten (Barthel, Luthardt et al. 2011). So ergab sich bei Barthel et al. im Rahmen einer Phase-0-Studie für den frontalen Kortex bei an Alzheimer-Demenz erkrankten Probanden eine SUVR von 1,82 und für die gesunden Kontrollprobanden eine SUVR von 1,39 ($p < 0,05$). [^{18}F]-Florbetaben besitzt eine hohe Sensitivität für die Alzheimer-Krankheit im Gegensatz zu anderen Demenzformen und Parkinson (Villemagne, Ong et al. 2011). Rominger et al. konnten mittels [^{18}F]-Florbetaben eine 16,6-prozentige Zunahme im frontalen Kortex von APP^{swe}-Mäusen von 13 auf 20 Monate detektieren (Rominger, Brendel et al. 2013). Vorteile dieses Tracers sind seine, vor allem im Vergleich zu [^{11}C]-PIB, lange Halbwertszeit und die daraus resultierende Verfügbarkeit ohne on-site-Zyklotron.

1.2.2.1.3 Weitere Amyloid-PET-Tracer

2011 untersuchte die Forschergruppe Poisnel das Radiopharmakon [^{18}F]-Florbetapir (= [^{18}F]-AV45) in Bezug auf dessen Uptake im Gehirn von APP/PS1-21-transgenen Mäusen mit C57B16-Mäusen als Kontrolle. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen transgenen Tieren und Kontrolltieren jeweils im Alter von 8 Monaten im Kortex, Hippocampus und Striatum festgestellt werden (Poisnel, Dhilly et al. 2012). Spill-over bzw. Signalüberlagerung und Partialvolumeneffekte wurden als Problemquellen identifiziert. Auch Rojas beschrieb einen 14,5-prozentigen Anstieg in der Brain/Cerebellum-Ratio mit [^{18}F]-AV45 in 5X-FAD-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Rojas, Herance et al. 2013). [^{18}F]-Flutemetamol zeigte im Gehirn von APP23-Mäusen analog zum Tracer [^{11}C]-PIB mit zunehmendem Lebensalter der Tiere eine vermehrte Anreicherung. In Tg576-Mäusen sowie in APP^{swe}-Mäusen konnte mit zunehmendem Alter der Tiere keine mit [^{11}C]-PIB vergleichbare Traceraufnahme beobachtet werden (Snellman, Rokka et al. 2014).

1.2.2.2 FDG-PET

[¹⁸F]-Fluordesoxyglukose (=FDG) findet nicht nur in der Tumordiagnostik Anwendung, sondern kann auch sowohl zur Detektion der AD in Frühstadien (Mosconi, Mistur et al. 2009) vor dem Auftreten von klinischen Symptomen als auch zur Überwachung des klinischen Fortschreitens verwendet werden (Nordberg, Rinne et al. 2010). Der Glukosemetabolismus bei AD ist in bestimmten Hirnregionen stark reduziert und die Aufnahme von FDG somit gering, wobei der Glukosehypometabolismus mit der Schwere der Krankheit korreliert (Mosconi 2005). Dadurch können auch Patienten mit einer Mild cognitive impairment (MCI) von Patienten, welche eine AD aus einer MCI entwickeln, unterschieden werden. Bei einer MCI ist der Glukosehypometabolismus vor allem im medialen Temporallappen lokalisiert, wohingegen bei Konversion einer MCI in eine AD die Glukoseaufnahme im posterioren cingulären Kortex am geringsten ist (Nordberg, Rinne et al. 2010). Die Aussagekraft des humanen FDG-PET lässt sich jedoch nicht auf das Kleintier-PET übertragen; so stellten Rojas et al. eine statistisch signifikante Mehranreicherung im Gehirn von fünffach transgenen 5XFAD-Mäusen im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren fest, welche der reaktiven Mikro- und Astrogliabildung auf Grund von neuroinflammatorischen Prozessen zugeschrieben wurde (Rojas, Herance et al. 2013).

1.2.2.3 Weitere Tracer

Neben Tracern für das extrazelluläre Amyloid existieren auch Radiopharmaka für die Detektion der intrazellulären Tau-Fibrillen. [¹⁸F]-THK5105 zeigte eine hohe Anreicherung im temporalen Kortex sowie eine gute Korrelation mit der kognitiven Leistungsfähigkeit sowie mit der *post mortem* feststellbaren Gehirnatrophie (Okamura, Furumoto et al. 2014). [¹¹C]-Nicotine, ein Tracer für nikotinerge

Rezeptoren, weist bei an Alzheimer-Demenz Erkrankten vor allem im Frontal- und Parietalkortex eine geringe Bindungsaffinität auf und korreliert stark mit Aufmerksamkeitsdefiziten (Kadir, Almkvist et al. 2006). Des Weiteren ist bei Morbus Alzheimer-Patienten eine verminderte Aufnahme von Radiotracern, welche an Dopamin- respektive an Serotoninrezeptoren binden, zu vermerken. Beispiele hierfür sind [¹¹C]-NNC756 als Tracer für Dopaminrezeptoren (Vallabhajosula 2011) und [¹⁸F]-MPPF als Tracer für Serotoninrezeptoren (Truchot, Costes et al. 2008). [¹¹C]-PK11195, welcher an Mikroglia-rezeptoren bindet und somit auf Neuroinflammation hinweist, zeigte im Gegensatz zu vorangegangenen Studien (Versijpt, Dumont et al. 2003) bei an milder bis moderater AD erkrankten Patienten keine erhöhte Aufnahme (Wiley, Lopresti et al. 2009).

1.2.3 Therapiemonitoring an Hand von longitudinalen PET-Studien

Durch die ständigen Fortschritte in der PET-Diagnostik erhofft man sich ein sensitives Monitoring von künftigen Therapiemöglichkeiten, wobei momentan die diagnostischen Fortschritte viel größer sind als die therapeutischen. Longitudinale PET-Studien im Mausmodell zeigten, dass sich die Zunahme der β -Amyloidplaques im Gehirn durch PET-Diagnostik adäquat wiedergeben lässt. Die im PET erhobenen Daten konnten durch verschiedene etablierte biochemische und histologische Verfahren reproduziert werden. So zeigte unsere Arbeitsgruppe eine Zunahme der durch [¹⁸F]-Florbetaben detektierten SUVR von APP^{swe}-Mäusen im Alter von 16 Monaten (+7,9 %) und mit 20 Monaten (+16,6 %) im Vergleich zu den Baseline-Scans im Alter von 13 Monaten. Diese Ergebnisse ließen sich durch *ex vivo*-Autoradiographie und Histopathologie bestätigen (Rominger, Brendel et al. 2013). Auch Snellman et al. konnten eine Zunahme der frontalen Kortex/Cerebellum-Ratio im [¹¹C]-PIB-PET bei APP23-Mäusen im Alter von 18 Monaten feststellen, welche

durch *ex vivo*-Autoradiographie und Thioflavin-S-Färbung bestätigt wurde (Snellman, Lopez-Picon et al. 2013). Manook et al. zeigten ebenso eine Zunahme des Tracers [¹¹C]-PIB bei 21 Monate alten APP/PS1-Mäusen im Vergleich zu neun Monate alten Tieren, wobei homozygote Individuen nochmals stärker anreicherten als hemizygoten. Diese Erkenntnisse wurden ebenfalls durch Biodistribution, Autoradiographie, ELISA, Fluoreszenzmikroskopie und Histologie bestätigt (Manook, Yousefi et al. 2012). Kuntner et al. konnten jedoch keinen Unterschied in der Anreicherung von [¹⁸F]-FDDNP, einem weiteren Amyloid-Tracer, im Gehirn von 13 bis 15 Monate alten Tg2576-Mäusen im Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Tieren feststellen (Kuntner, Kesner et al. 2009). Ein Therapieerfolg ließe sich somit durch verminderte Traceraufnahme im PET diagnostizieren.

1.3 Verschiedene transgene Mausmodelle

Zum Zwecke der Alzheimer-Demenz-Forschung wurden viele verschiedene Mausmodelle entwickelt, teils mit dem Ziel, den pathologischen Veränderungen im menschlichen Gehirn möglichst nahe zu kommen, teils mit der Intention, Mausmodelle zu generieren, die schnellstmöglich A β -Plaques und Tau-Fibrillen bilden. Die erzeugten Mutationen befinden sich meistens im APP-Gen und teilweise zusätzlich im Presenilin 1- respektive 2-Gen. Insgesamt gibt es aktuell 77 transgene Mausmodelle, welche eine Mutation in mindestens einem der drei genannten Gene enthalten (<http://www.alzforum.org/research-models>).

1.3.1 APP-Mutationen

Wie in 1.1.3.1 beschrieben, entstehen die A β -Peptide aus dem APP nach Spaltung durch die Enzyme β -Sekretase und γ -Sekretase. Bei der familiären Form der Alzheimer-Krankheit bestehen Mutationen im APP-Gen, welche eine verfrühte und

vermehrte A β -Bildung bedingen. Diese Mutationen werden extrahiert, kloniert und anschließend in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA), welche für das humane β APP kodiert, eingefügt, sodass humanes APP z.B. mit der Schwedischen Doppelmutation (K670N, M671L) überexprimiert wird. Das so entstandene transgene Fragment wird durch Insertion einem Promoter unterstellt. Die generierten DNA-Fragmente mit der entsprechenden Mutation werden in Zygoten injiziert, welche wiederum in die Eileiter von Mäusen implantiert werden (Richards, Higgins et al. 2003). Die dadurch erzeugten transgenen Mäuse entwickeln AD-typische Symptome wie Gedächtnisverlust und Amyloidplaques, jedoch keine Tau-Fibrillen und kaum Neuronenuntergang (Teipel, Buchert et al. 2011).

1.3.2 Presenilin 1- und 2-Mutationen

Presenilin ist ein regulierender Kofaktor (De Strooper, Saftig et al. 1998) des Enzyms γ -Sekretase. Mutationen in den Homologen Presenilin 1 und 2, welche auch bei der familiären Alzheimer-Krankheit auftreten, beschleunigen die Bildung von β -Amyloidplaques bei gleichzeitig bestehender Mutation im APP-Gen und nehmen somit die Funktion eines Akzelerators ein (Teipel, Buchert et al. 2011). Dadurch sind Amyloidakkumulationen bei APP-PS1-transgenen Mäusen bereits ab einem Alter von eineinhalb bis zwei Monaten im PET nachweisbar (Teipel, Buchert et al. 2011, Poisnel, Dhilly et al. 2012). Eine Punktmutation im Presenilin 1-Gen erhöht selektiv A β 1-42 (De Strooper, Saftig et al. 1998) und durch Ausschaltung dieses Gens in Knockout-Mäusen konnte die A β -Produktion in Zellkulturen des Gehirns über eine Hemmung der γ -Sekretase stark verringert werden (De Strooper, Saftig et al. 1998). Bei gleichzeitiger Ausschaltung von Presenilin 1 und 2 in embryonalen Stammzellen war keine γ -Sekretaseaktivität mehr vorhanden (Herreman, Serneels et al. 2000). Die entsprechende Mutation bei der familiären Alzheimer-Demenz wird wie bei der APP-

Mutation mittels Vektor in humane PS1- oder PS2-cDNA eingefügt (Richards, Higgins et al. 2003).

1.4 Therapiemöglichkeiten

Die therapeutischen Möglichkeiten bei der Alzheimer-Demenz sind aktuell weit weniger entwickelt als die diagnostischen. Es handelt sich bei den momentanen Maßnahmen ausschließlich um symptomlindernde Medikamente und Therapien, welche die Gedächtnisleistung und die Selbstständigkeit im Alltag fördern sollen.

1.4.1 Etablierte Therapien

1.4.1.1 Acetylcholinesterase-Hemmer

Acetylcholinesterase-Hemmer sind Arzneimittel 1. Wahl bei der Therapie der milden und moderaten Form der Alzheimer-Demenz. Die drei Hauptvertreter sind Donepezil, Galantamin und Rivastigmin, welche das Enzym Acetylcholinesterase reversibel hemmen und somit die Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt erhöhen, da bei AD-Patienten die AcetylcholinKonzentration im Gehirn sehr gering ist. Regelmäßig auftretende anticholinerge Nebenwirkungen sind Schwindel, Übelkeit, Diarrhoe, Gewichtsverlust und Schläfrigkeit (Burns, O'Brien et al. 2006). Alle drei Arzneimittel wirken dosisabhängig, weswegen die maximal verträgliche Dosis angestrebt werden soll (Karow Thomas, Lang-Roth Ruth: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 21. Auflage, 2013, S. 974). Rivastigmin hemmt zusätzlich die Butyryl-Cholinesterase, welche neben Butyrylcholin auch Acetylcholin als Substrat hydrolysiert (Bullock, Touchon et al. 2005), und wird als einziger Acetylcholinesterase-Hemmer nicht durch Cytochrom P450 metabolisiert (Karow Thomas, Lang-Roth Ruth: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 21. Auflage, 2013, S. 975). Es handelt sich um eine symptomatische

Behandlung, wodurch eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten und eine Verlangsamung des Voranschreitens der Krankheit erreicht werden kann, jedoch keine Heilung.

1.4.1.2 Memantin

Neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einer Überstimulation am N-Methyl-D Aspartat-Rezeptor (NMDA) für Glutamat, dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter, einher. Memantin, welches Mittel 1. Wahl bei mittelschwerer bis schwerer AD ist, wirkt antagonistisch am NMDA-Rezeptor und verbesserte dadurch in einer 2003 erhobenen Studie von Reisberg et al. die Gedächtnisleistung und die alltäglichen Fähigkeiten von Senioren, die an mittlerer bis schwerer Alzheimer-Demenz erkrankt sind, im Vergleich zu einer Placebo-kontrollierten Gruppe. 252 Patienten nahmen an der randomisierten Studie teil, welche sich über 28 Wochen erstreckte (Reisberg, Doody et al. 2003). Nebenwirkungen von Memantin sind Halluzinationen, Schwindel und Müdigkeit (Karow Thomas, Lang-Roth Ruth: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 21. Auflage, 2013, S. 976). Bei Memantin handelt es sich ebenso wie bei den Acetylcholinesterase-Hemmern um eine rein symptomatische Therapie.

1.4.2 Weitere Therapieansätze

Nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente (NSAIDs) besitzen zwar keine Zulassung für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit, deren antiinflammatorische Wirkung hat jedoch auch im ZNS eine positive Auswirkung. So zeigten Imbimbo et al. 2009 eine signifikante Reduktion der Plaque-assoziierten Mikroglia um 57 % im Kortex und um 54 % im Hippocampus nach einer sechsmonatigen Behandlung mit Ibuprofen bei sechs Monate alten APP-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren (Imbimbo, Hutter-Paier et al. 2009). Es konnte jedoch keine

Plaquereduktion nachgewiesen werden. NSAIDs haben somit einen positiven Effekt auf die Prävention der AD, eignen sich jedoch nicht zu deren Behandlung (Sun, Jin et al. 2012). Unter Nootropika versteht man Antidementiva, deren antidementielle Wirkung wissenschaftlich nicht sicher belegt ist, welche jedoch in klinischen Studien eine antidementielle Wirkung erkennen ließen. Beispiele hierfür sind Piracetam, ein cyclisches Derivat von GABA (Waegemans, Wilsher et al. 2002), und Gingko (Schulz 2003).

1.4.3 Neue medikamentöse Therapieansätze

Neben neuen Therapiestrategien wie z.B. dem Einsatz von Retinolsäure als Antioxidans (Lee, Casadesus et al. 2009), der Anwendung von Phospholipase A2-Hemmern (Sun, He et al. 2012) oder von Leptin als Antidementivum (Tezapsidis, Johnston et al. 2009) bestehen neue therapeutische Ansätze in der Beeinflussung der Enzyme β -Sekretase und der γ -Sekretase sowie in der Immunisierung gegen A β .

1.4.3.1 GSI vs. GSM

Zuerst wurden sogenannte Gamma-Sekretase-Inhibitoren (GSI) erprobt, welche jedoch zahlreiche Nebenwirkungen, wie z.B. Hautausschlag, Hautkrebs, Immunsuppression, Hemmung der intestinalen Zelldifferenzierung und auch eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten verursachten (Wong, Manfra et al. 2004, Rogers, Felsenstein et al. 2012). Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich die ausbleibende Prozessierung des Notch-Rezeptors, welcher eines der ca. 70 Substrate der γ -Sekretase darstellt und an der normalen Zelldifferenzierung beteiligt ist (Wong, Manfra et al. 2004). Sivilia et al. konnten nach 13-monatiger täglicher Therapie mit 60 mg/kg des GSI DAPT zwar eine Reduktion des intraneuronalen A β bei Tg2576-Mäusen nachweisen, jedoch keine Verbesserung des Erinnerungsvermögens der Mäuse im „Novel object recognition test“, keine

verminderte Plaqueload und keine verminderte Mikrogliaaktivierung im Vergleich zu einem Placebo. Bei der 13-monatigen Behandlung mit 60 mg/kg des Gamma-Sekretase-Modulators (GSM) CHF5074 wurde eine ca. 50-prozentige Reduktion der mit Plaques besiedelten Gehirnofläche („plaque area fraction“) im Kortex und im Hippocampus im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet, sowie eine verbesserte Erinnerungsfähigkeit und weniger Mikrogliaaktivierung (Sivilia, Lorenzini et al. 2013). Ähnlich verhielt es sich bei Imbimbo et al., welche nach 17-wöchiger Therapie mit 375 ppm (= 60 mg/kg) desselben GSM im Kortex eine Reduktion der Plaque-besiedelten Fläche um 52,2 % und der Plaqueanzahl um 48,9 % erzielten (Imbimbo, Del Giudice et al. 2007). Zahlreiche GSM verringern signifikant sowohl den Gehirnoflächenanteil, welcher durch die Amyloidplaques eingenommen wird, als auch die Anzahl der Plaques im Neokortex und Hippocampus, wobei diese Medikamentengruppe jedoch keinen Effekt auf die Plaquegröße erkennen lässt (Imbimbo, Del Giudice et al. 2007, Imbimbo, Hutter-Paier et al. 2009, Kounnas, Danks et al. 2010, Van Broeck, Chen et al. 2011, Rogers, Felsenstein et al. 2012, Sivilia, Lorenzini et al. 2013). GSMs bewirken eine dosisabhängige Verschiebung der Amyloidproduktion mit weniger A β 42, welches amyloidogen wirkt (näheres s. Kap.4.4.1), zu Gunsten von kürzeren A β -Formen, wie z.B. A β 37 und A β 39 (Loureiro, Dumin et al. 2013), wobei das gesamte A β in etwa gleich bleiben sollte (Weggen, Eriksen et al. 2001). A β 38 wird bei chronischer Behandlung abhängig vom jeweiligen GSM gesenkt (Loureiro, Dumin et al. 2013), (Van Broeck, Chen et al. 2011), (Kounnas, Danks et al. 2010) oder erhöht.

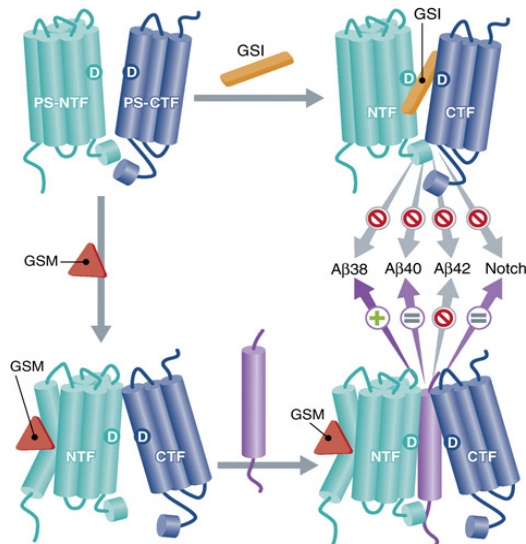


Abbildung 3: Wirkweise von GSI vs. GSM: Senkung aller β -Amyloidfraktionen sowie Inhibierung des Notch-Signalwegs und dadurch Hemmung der normalen Zelldifferenzierung durch GSI; selektive Reduktion des amyloidogenen A β 42 und keine Beeinflussung des Notch-Signalwegs durch GSM (<http://emboj.embopress.org/content/30/23/4696>)

1.4.3.2 BACE-Inhibitoren

BACE-Inhibitoren greifen am ersten Schritt der Amyloidogenese an, indem diese das Enzym β -Sekretase hemmen (s. Kap. 1.1.3.1). In mehreren präklinischen Studien konnte u.a. an Tg2576-Versuchsmäusen eine signifikante Abnahme der A β -Konzentration im Gehirn, im Liquor cerebrospinalis und im Blutplasma gezeigt werden. Um eine statistisch signifikante Verbesserung in Verhaltenstests wie z.B. den „Morris Water Maze“ Test zu erzielen, bedarf es einer mindestens viermonatigen Therapie und die Versuchstiere sollten zu Studienbeginn höchstens neun Monate alt sein. TAK-070, CMT-21166 and CTS-21166 sind Beispiele für BACE-Inhibitoren (Ghosh, Brindisi et al. 2012).

1.4.3.3 Immunisierung

Maeda et al. führten einen ersten Therapieversuch mittels einseitiger Anti-A β -Antikörperinjektion in den Hippocampus durch, wodurch die Amyloidlast im [^{11}C]-PIB-PET im behandelten Hippocampus gegenüber des unbehandelten Hippocampus um

28,1 % abfiel (Maeda, Ji et al. 2007). Bapineuzumab, ein monoklonaler Antikörper gegen β -Amyloid, lieferte in einer 78-wöchigen Phase-2-Studie einen statistisch signifikanten Unterschied im [^{11}C]-PIB-PET zwischen Bapineuzumab und Placebo (Rinne, Brooks et al. 2010). Klinische Studien hierzu zeigten eine begrenzte Wirksamkeit, welche primär auf ein Frühstadium der AD begrenzt ist, und wiesen zahlreiche Nebenwirkungen, wie z.B. Inflammationsprozesse im Gehirn, auf (Lemere 2009).

1.5 Ziel der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand im longitudinalen *in vivo*-Monitoring des Amyloidose-Progresses bei zu Studienbeginn 12 Monate alten APP^{swe}-Mäusen über einen Zeitraum von sechs Monaten, wobei ein Baseline-Scan zu Studienbeginn, ein erster Follow-up-Scan nach vier Monaten und ein zweiter Follow-up-Scan (= finaler Scan = Endpunkt Scan) zu Studienende mittels Kleintier-Amyloid-PET mit dem Tracer [^{18}F]-Florbetaben als diagnostischem Tool erhoben wurde, um die Plaquentwicklung im zeitlichen Verlauf engmaschig und non-invasiv darstellen zu können. Hierbei wurde eine transgene Versuchsgruppe mit dem täglich verabreichten Gamma-Sekretase-Modulator RO5506284 therapiert und die Traceranreicherung im Gehirn mit gleichaltrigen, Placebo-therapierten, transgenen Tieren verglichen. Im Gegensatz zu vielen bisherigen, meist unimodalen Studien schloss sich eine multimodale histologische und biochemische *ex vivo*-Untersuchung der Gehirne nach dem finalen PET-Scan an. Hierbei sollten die nuklearmedizinischen Ergebnisse validiert und um ergänzende Informationen auf zellulärer und molekularer Ebene erweitert werden. Die Hypothese lautet, dass mittels einer chronischen Applikation eines GSM die Amyloidogenese verlangsamt bzw. gestoppt werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Therapiesubstanz RO5506284 und Applikation

Der in dieser Arbeit verwendete GSM RO5506284 (Strukturformel s. Abbildung 4) stammt von der Firma Hoffmann–LaRoche. Die Dosisfindung für die chronische Treatment-Studie erfolgte durch orale Applikation mittels Schlundierung einer Einmalgabe des GSM in einer Dosierung zwischen 3 und 100 mg/kg, wobei eine Opferung der Versuchstiere durch zervikale Dislokation und Bestimmung der Menge an löslichem A β 42 im Mausgehirn zwischen 2 und 24 Stunden nach Substanzverabreichung erfolgte. Die beste Dosis-Wirkungsrelation ergab sich vier Stunden nach oraler Applikation einer Dosis von 30 mg/kg mit 48-prozentiger Reduktion von A β 42 im Vergleich zu in sterilem Wasser gelöstem 5-prozentigem Ethanol und 10-prozentigem Solutol als Vehikel-Substanz (s. Abbildung 5). Zugleich wurde ein Anstieg des A β 38 beobachtet, wobei die Gesamt-Amyloidmenge nicht beeinflusst wurde. Die Verabreichung sowohl des GSM als auch der 0,9-prozentigen NaCl-Lösung als Vehikel-Substanz in der sechsmonatigen Studie erfolgte einmal täglich am Vormittag immer in etwa zur gleichen Zeit mittels Schlundierung über eine starre Knopfkanüle (1,0x40 mm) von der Firma ACUFIRM (s. Abbildung 6).

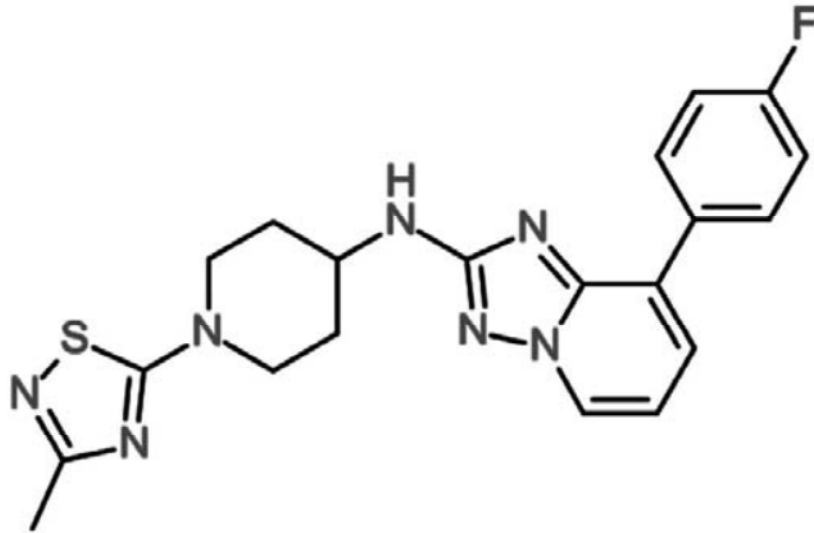


Abbildung 4: Strukturformel von RO5506284

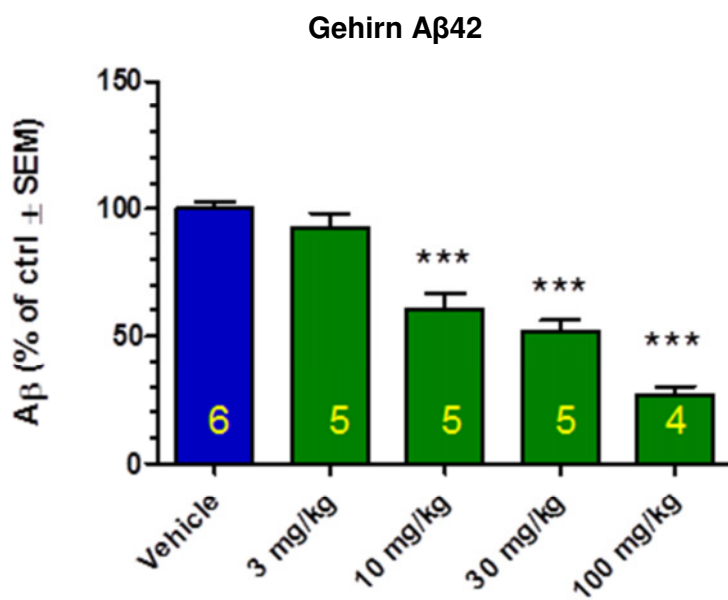


Abbildung 5: A β 42-Reduktion vier Stunden nach einmaliger oraler Applikation des GSM RO5506842 in unterschiedlicher Dosierung; (***) statistisch signifikant mit $p < 0,001$

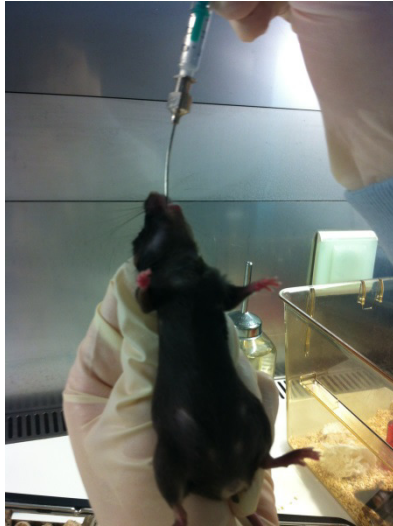


Abbildung 6: Schlundierung eines Versuchstieres mittels Knopfkanüle

2.1.2 Charakteristika der Studie

Der zeitliche Studienaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt. Vor Studienbeginn wurden sowohl die Gruppe der transgenen als auch der Kontrolltiere mit je 24 Tieren in zwei gleich große Hälften randomisiert, wobei jeweils eine Gruppe den zu erprobenden GSM RO5506284 der Firma Hoffmann –La Roche erhielt und die andere Gruppe die Vehikel-Substanz. Die Dosierung der beiden Substanzen betrug 30 mg/kg Körpergewicht bzw. 10 ml/kg Körpergewicht. Im Laufe der Studie wurden bei jeder Maus insgesamt drei PET-Scans durchgeführt, wobei innerhalb einer Woche PET-Bilder für jede der 48 Mäuse generiert wurden. Im Juni 2013 erfolgte zu Studienbeginn ein Baseline-Scan jeder Maus. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere 12 Monate alt. Im Oktober und im Dezember folgten der zweite und dritte Scan. Zwei Tage nach dem dritten Scan wurden die Mäuse mittels Perfusion mit 4-prozentiger Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) in tiefer Anästhesie mit Ketamin geopfert. Es wurde arterielles Blut zur Bestimmung der Plasmakonzentration des GSM entnommen. Ebenso wurde das Gehirn entnommen und in die beiden Hemisphären geteilt. Die zwei Hemisphären wurden randomisiert aufgeteilt, wobei je eine gleich

große Zahl an rechten und an linken Hirnhälften für die pathologische und die biochemische Untersuchung bestimmt waren. Die Hemisphäre für die Histopathologie wurde nach Entnahme in 4-prozentigem Paraformaldehyd (PFA) konserviert. Die zweite Hemisphäre wurde nach Immersion in flüssigem Stickstoff auf Trockeneis bei -80°C gelagert, um sie einer biochemischen quantitativen Bestimmung der A β -Proteine mittels ELISA zuzuführen.

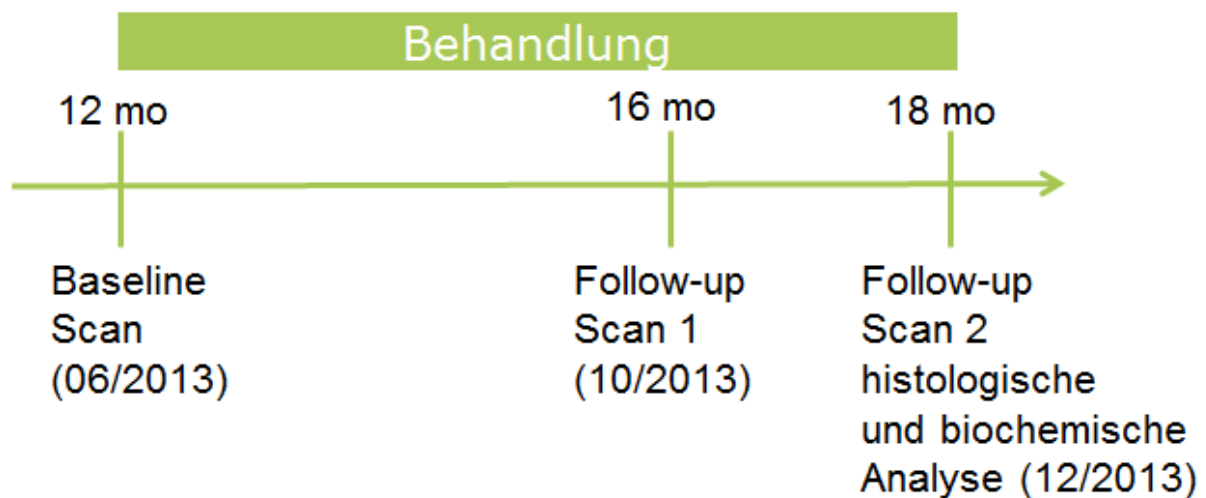


Abbildung 7: zeitlicher Studienaufbau

2.1.3 Micro-PET-Scanner

Es wurde ein Inveon Kleintier-PET-Scanner der Firma Siemens für alle Versuche verwendet. Dieses PET-Gerät hat ein axiales Gesichtsfeld von 12,7 cm und einen Durchmesser von 16,1 cm. Es verfügt über eine hohe Sensitivität und hohe räumliche Auflösung, welche jedoch durch Rebinning und eine zweidimensionale Rekonstruktion verloren gehen. Dieser Bildqualitätsverlust lässt sich durch eine dreidimensionale Rekonstruktion mit OSEM3D (3D ordered-subset expectation maximization) und MAP3D (maximum a posteriori reconstruction) verhindern (Visser, Disselhorst et al. 2009). Um während einer Studie die zu verschiedenen Zeitpunkten generierten PET-Bilder vergleichbar zu machen, werden alle evaluierten Parameter

beibehalten, um die Fehlerfreiheit und Genauigkeit nicht zu beeinträchtigen (Mannheim, Judenhofer et al. 2012).

2.1.4 Ablauf der μ PET-Scans

An einem Versuchstag wurden jeweils vier Mäuse gleichzeitig gescannt und zwar je eine Maus aus den vier verschiedenen Studiengruppen. Im Scanner befanden sich somit zeitgleich eine Maus der Gruppe TG-GSM, TG-VEH, WT-GSM und WT-VEH. Den Versuchsaufbau zeigt Abbildung 8. Die jeweiligen Mäuse wurden in einer Einzelbox zwischengelagert, von welcher sie in die Narkosebox gebracht wurden. Die Narkose erfolgte mittels 2 % Isofluran zur Einleitung und 1,5 % zur Aufrechterhaltung mit einer Flussgeschwindigkeit von 3,5 l/min. Insgesamt befanden sich die Tiere für eine Dauer von 100 ± 6 min in Narkose. Den narkotisierten Mäusen wurde ein Schwanzvenenkatheter in eine der beiden lateralen Schwanzvenen gelegt, über welchen allen vier Mäusen zeitgleich der Tracer [^{18}F]-Florbetaben mit einer Aktivität von $11,1 \pm 2,4$ MBq in einem Volumen von $121,8 \pm 29,1$ μl injiziert wurde. Anschließend wurde die Gruppenzugehörigkeit der zu scannenden Mäuse noch durch vier verschiedenfarbige, am Schwanz befestigte, Klebestreifen abgesichert und es wurde ein Foto gemacht. Dann wurden die Mäuse in der Scanbox positioniert und im Siemens Inveon Kleintier-PET-Scanner 45 min lang statisch gescannt. Nach Scanende wurden die Schwanzmarkierungen entfernt und die vier Mäuse wurden wieder in je eine eigene Box gelegt, in welcher sie sich von der Narkose erholen konnten. Nach vollständigem Erwachen kamen sie zurück in ihre Käfige, in welchen sich insgesamt drei bis sechs Mäuse befanden.

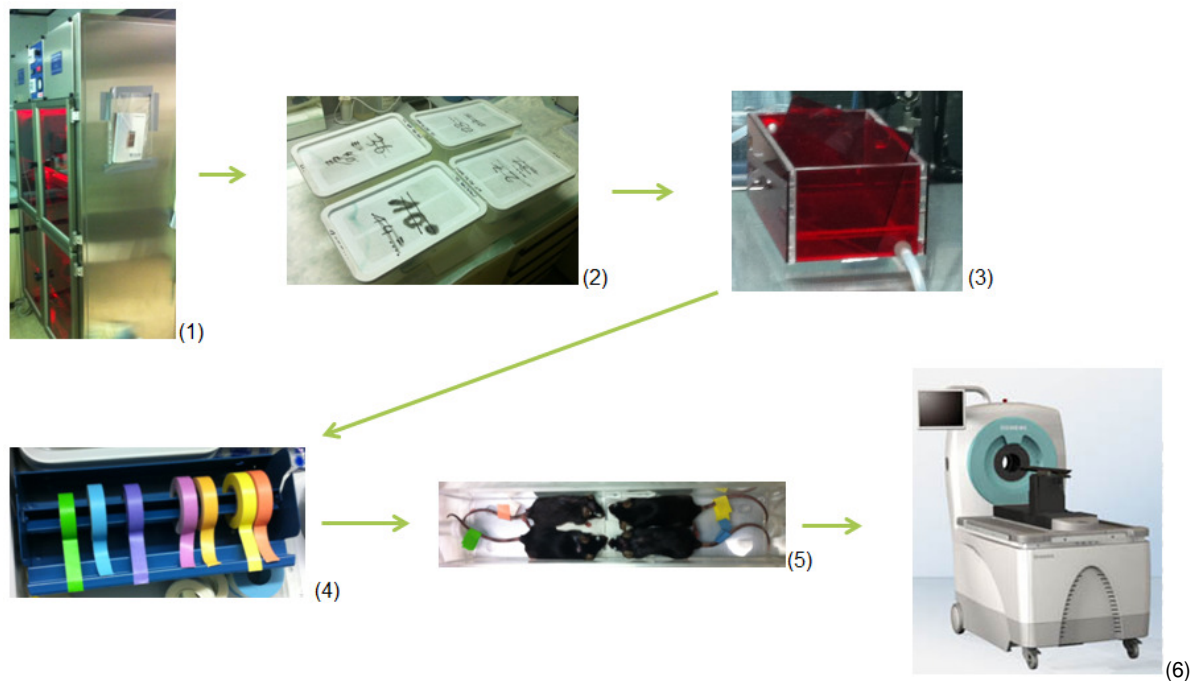


Abbildung 8: Versuchsaufbau: Transport der Tiere vom Tierstall (1) über eine Einzelbox (2) in die Narkosebox (3) und nach Narkotisierung, Tracerinjektion und Anbringen einer farbigen Schwanzmarkierung(4) Positionierung in der Scanbox (5) und anschließend Positionierung im μ PET-Scanner (6)

2.2 Transgenes Tiermodell

Alle Experimente wurden unter Einhaltung der Richtlinien des nationalen Tierschutzes, Deutschland, und mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt. Es wurden 12 Monate alte APPswe-transgene Mäuse mit der sog. Schwedischen Doppelmutation (K670N, M671L) unter dem Promoter Thy1.2 von der Firma Hoffmann–LaRoche (n=24, weiblich), welche das humane Amyloid-Precursor-Protein überexprimieren (hAPP), verwendet (Richards, Higgins et al. 2003) (s. Kap. 1.3.1). Als Kontrolle dienten gleichaltrige Wildtypiere, nämlich C57BL/6-Mäuse (n=24, weiblich) der Firma Charles River. Die ersten β -Amyloid-Akkumulationen zeigen sich bei diesen transgenen Versuchstieren im Alter von ca. neun Monaten. β -Amyloidplaques sind im Alter von ca. 12 Monaten erstmals nachweisbar, welche nach weiteren sechs Monaten ihren Höhepunkt erreichen. Die Tiere waren in einem Tierstall mit konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit untergebracht. Es herrschte

ein Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden. Eine Nummerierung von 1 bis 48 erfolgte durch Ohrlochmarkierung und Schwanzmarkierung mit Strichen und Punkten.

2.3 Radiosynthese von [¹⁸F]-Florbetaben

Der Tracer wurde in der Radiopharmazie der Nuklearmedizin in Großhadern synthetisiert. F18 wurde kommerziell erworben. Dieses Radionuklid wurde mittels eines Zyklotrons durch die $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ -Reaktion hergestellt und lief als wässrige Lösung in [¹⁸O] sauerstoffreichem Wasser durch eine Cromafix PS-HCO₃-Kartusche (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Nach Trocknung der Kartusche im Heliumstrom wurde die [¹⁸F]-Aktivität mit 1 ml Lösung von Kryptofix 222 (K222)/K₂CO (12,5 mg K222 und 12,5 µl von 1 M K₂CO₃ in CH₃CN/H₂O 0,8/0,2) eluiert. Das Lösungsmittel wurde bei 90°C unter Heliumzustrom entfernt und der Rest wurde zunächst zweimal azeotrop mit 0,8 ml wasserfreiem CH₃CN bei 90°C und anschließend nochmals fünf Minuten im Vakuum getrocknet. Danach wurden der [¹⁸F]-Aktivität 5 mg Mesylat-Vorläufer in 1 ml wasserfreiem CH₃CN hinzugegeben und für 12,5 Minuten auf 100°C erhitzt. Anschließend wurde HCL (2 M wässrige Lösung, 0,5 ml) hinzugefügt und die Lösung wurde für 7,5 Minuten bei 100°C umgerührt. Nach Herunterkühlung auf ca. 60°C wurde eine Lösung mit 1 ml einer 1M NaOH und 2 ml von 0,1 M Ammoniakformiat hinzugefügt. Die schwach milchige Lösung wurde mit 1 bis 2 ml CH₃CN aufgelöst und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt. Die Fraktion mit dem gewünschten Produkt wurde mit einer Retentionszeit von 12 Minuten ausgelöst und mit 10 mg/ml Natriumaskorbat in 12 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wurde durch eine Sep-Pak Light C18 Kartusche geleitet und mit Wasser, in welchem 10 ml von 20-prozentigem Ethanol und 10 mg/ml Natriumaskorbat enthalten waren, gespült, um die Reaktionsnebenprodukte abzutrennen. Das Endprodukt

[¹⁸F]-Florbetaben wurde aus der Kartusche durch 1 bis 2 ml Ethanol eluiert. Für die Experimente wurde das Eluat in 100 µl große Portionen aufgeteilt, welche mit je 900 µl Lösung bestehend aus 1,78 ml PEG400, 6,72 ml H₂O, 44 mg Ascorbinsäure und 288 mg Natriumaskorbat versetzt wurde. Ein pH von 7,4 wurde durch 75 µl konzentrierten Phosphatpuffer (Braun, Melsungen, Germany) erreicht. Es wurde durchschnittlich eine spezifische Aktivität von 1850 GBq/mmol und eine radiochemische Reinheit von über 98 % erreicht, welche mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Agilent XDB-C18 analytische Säule (150×4,6 mm, 5 µm), CH₃CN/ Ammoniakformiat Puffer (0.1 M, mit 5 mg/ml Natriumaskorbat) 60/40; Flussrate 1 ml/min) bestimmt wurden. Zudem wurde der Wert der spezifischen Aktivität durch den Vergleich des UV-Peaks des aufgereinigten Florbetabens mit einem radioaktiven Stoff bekannter Konzentration abgeschätzt. Der radiochemische Ertrag betrug 18 % (zerfallskorrigiert) und die Retentionszeit des Produkts 6,2 Minuten (Rominger, Brendel et al. 2013). Die vollständige Synthese dauerte in etwa 75 Minuten.

2.4 Datenakquisition und Bildrekonstruktion

Der Scan startete 30 Minuten nach Injektion des Tracers. Die Mäuse verblieben für 45 Minuten im Scanner, wobei 30 Minuten auf die statische Emission und 15 Minuten auf die Transmission zur Schwächungskorrektur verfielen (Rominger, Brendel et al. 2013). Es wurde eine rotierende [⁵⁷Co]-Quelle verwendet. Zur Bildrekonstruktion wurden folgende Algorithmen verwendet: eine OSEM3D mit vier Iterationen und ein MAP3D mit 32 Iterationen, ein Zoom-Faktor von 1,0, eine Zerfall- und Schwächungskorrektur, eine Matrix von 128 x 128 x 159 und eine Voxelgröße von 0,78 x 0,78 x 0,8 mm³. Hierbei handelt es sich um vorab validierte Parameter.

2.5 PET-Datenanalyse

2.5.1 VOI-basierte Auswertung

Die resultierenden PET-Bilder wurden mittels PMOD fusion tool (Version 3.303; PMOD Technologies Ltd., Zürich, Schweiz) auf ein zuvor in der Radiologie in Großhadern mit einem drei Tesla MRT-Gerät (Magnetom Verio, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland) generiertes MRT-Bild fusioniert. Dabei wurde das PET-Bild um die axiale, koronare und sagittale Achse gedreht und entlang dieser drei Achsen verschoben, bis eine möglichst genaue Überlagerung von PET- und MRT-Bild erreicht wurde. Anschließend wurden durch einen zweistelligen Buchstabencode die Mausdaten verblindet. So wurde z.B. der Maus „01“ der Code „NF“ und der Maus „02“ die Kombination „TW“ zugeordnet. Ein zweiter Reader führte eine akkurate Fusion von PET-Bild und MRT-Bild mit den verblindeten Daten durch. Dieses Prozedere wurde zu Gunsten einer maximalen Objektivität und Standardisierung eingehalten. An den finalen PET-Scan anschließend wurden die einzelnen PET-Bilder auf ihre entsprechende PET-Vorlage aus dem Baseline-Scan fusioniert. Es erfolgte eine Volume of interest-basierte (VOI) Auswertung. Die VOI für das Cerebellum betrug 36 mm^3 , für den frontalen Kortex 19 mm^3 und für den Hippocampus 9 mm^3 . Für den Kortex wurde die SUVR mit dem Cerebellum als Referenzregion berechnet.

2.5.2 PVEC (Partialvolumeneffekt-Korrektur)

Beim Amyloid-PET werden die A β -Plaques als Hot-Spots dargestellt, welche jedoch durch benachbarte Strukturen mit geringer Traceraufnahme abgeschwächt werden und somit in der Umgebung verwischen können, so z.B. Plaques im Frontalkortex durch die Harderschen Drüsen. Dadurch ergeben sich falsch niedrige Werte. Diese unkorrigierten Werte wurden einer VOI-basierten PVEC-Korrektur nach Rousset

unter Verwendung des Auswertetools PMOD unterzogen, um oben beschriebene Spill-in- und Spill-over-Effekte der kortikalen Kompartimente auszugleichen. Extrakortikale Regionen wurden hierbei ebenfalls berücksichtigt. Durch die PVEC werden Genauigkeit und Fehlerfreiheit der PET-Ergebnisse optimiert. Die PVEC-korrigierten, VOI-basierten $SUVR_{CTX/CBL}$ -Mausdaten beschreiben eine Exponentialfunktion in Abhängigkeit der unkorrigierten $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werte. Es wurden zehn VOIs definiert bzw. verwendet, im Genauen zwei frontal-kortikale, ein zerebelläres, ein Kompartiment für die Weiße Substanz und sechs extrakortikale inklusive der Harderschen Drüsen. Für diese zehn-Regionen-Maske mit vier intra- und sechs extrazerebralen VOIs konnte die Abweichung von den Ergebnissen aus Gamma-Counter-Messungen und Autoradiographie möglichst klein gehalten werden. Man bedarf dieser großen Anzahl an VOIs auf Grund der heterogenen Traceraufnahme in verschiedenen Geweben, vergleiche hierzu die unspezifische [^{18}F]-Florbetaben-Aufnahme in der Weißen Substanz. Es wurde eine Halbwertsbreite von 1,72 mm verwendet, da diese am präzisesten die räumliche Auflösung des PET-Scanners in Kombination mit den verwendeten Rekonstruktionsalgorithmen widerspiegelt. Durch die PVEC können Sensitivität und statistische Power eines vermuteten Therapieeffekts erhöht werden, wodurch sich in Therapiestudien die Fallzahlen verkleinern lassen (Brendel, Delker et al. 2014).

2.6 Histopathologische Untersuchungen

Es wurde eine Färbung mit Methoxy-X04, einem Kongorot-Derivat, durchgeführt. Jeweils eine Hemisphäre wurde nach Euthanasierung der Tiere in 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C für zwei Tage konserviert. Nach dem Schneiden von mehreren 50 μ m dicken Sagittalschnitten, welche ca. 1,5 mm von der Mittellinie entfernt waren, mit einem Vibratom (VT 1000 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden

die Schnitte über Nacht durch 2-prozentige Triton X-100 Lösung in PBS bei einem pH von 7,4 permeabel gemacht. Plaques wurden mit 0,01 mg/ml der fluoreszierenden Methoxy-X04-Färbung, welche in PBS gelöst war, bei einem pH von 7,4 für 15 Minuten angefärbt. Das ungebundene Methoxy-X04, welches spezifisch an Plaques, Tangles und an zerebrovaskuläres Amyloid bindet (Klunk, Bacskai et al. 2002), wurde in drei Waschschrritten mit PBS entfernt und die Schnitte wurden mittels fluoreszierendem „Dako“ auf Mikroskopierplättchen befestigt. 3D-Bilder wurden mit einem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 7MP, Zeiss, Jena, Deutschland), welches über einen MaiTai DeepSee fs-laser (Spectra-Physics, Darmstadt, Deutschland) verfügt, generiert. Es wurde ein „tile“-Scanmodus verwendet, mit welchem die verschiedenen Sichtfelder aneinander gereiht werden konnten. Methoxy-X04 wurde bei 405 nm angeregt und das ausgesandte Licht wurde von 410 bis 585 nm eingesammelt. Es wurden Plaqueload und Plaquedichte bestimmt. Bei der Plaqueload handelt es sich um den prozentualen Anteil der Gehirnofläche (%), welcher mit Amyloidplaques belastet ist. Die Plaquedichte ist ein Maß für die Anzahl an Plaques pro Gehirnvolumen (N/mm^3). Durch Division der Plaquedichte durch die Plaqueload lässt sich auf die Größe der Plaques schließen. Ein hoher Wert spricht für viele, kleine Amyloidplaques und ein niedriger Wert für wenige, große.

2.7 Biochemische Untersuchungen

Die entsprechende bei $-80^{\circ}C$ auf Trockeneis gelagerte Hemisphäre wurde mit Diethylamin und Natriumchlorid homogenisiert, drei Stunden auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Zentrifugationsrückstand wurde zur Extraktion des unlöslichen Amyloids aus den Amyloidplaques in UREA-Puffer (9 M urea, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4)) gelöst und erneut bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Mittels Sandwich Immunoassay wurde die Menge an

unlöslichem A β 38, A β 40, A β 42 und des gesamten A β bestimmt. Es wurde ebenso lösliches Amyloid mittels DEA (Diethanolamin) extrahiert und durch einen ELISA quantifiziert.

2.8 Statistik

Für die Gruppenvergleiche der VOI-basierten PET-Ergebnisse wurde eine multivariate Varianzanalyse (MANOVA) durchgeführt. Die Histologie- und Biochemiedaten der transgenen Tiere und der Kontrolltiere wurden mittels multivariater Kovarianzanalyse (MANCOVA) verglichen, wobei das Baseline-PET als Kovariable fungierte. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Der zweiseitige Zweistichproben-t-Test (student t-test) wurde bei Normalverteilung angewandt und der nicht parametrische Wilcoxon-Test bei nicht normalverteilten Daten. Für die Korrelationsanalysen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (R) berechnet. Zur Ablehnung der Nullhypothese wurde eine Schwelle von $p < 0,05$ definiert. Es wurde das IBM SPSS Statistics-Programm (Version 22.0; SPSS) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Basischarakteristika und Entwicklung der Tierpopulation

Von 41 (85 %) der zu Beginn in die Studie eingeschlossenen 48 Mäuse konnten Baseline-Scan, Follow-up 1-Scan sowie Follow-up 2-Scan und die Hirnentnahme für histologische und biochemische Analysen durchgeführt werden. Während der sechsmonatigen Therapie ergab sich ein Dropout (2 %) bei den behandelten transgenen Tieren (TG-GSM) im Alter von 16,5 Monaten auf Grund eines abdominalen Lymphoms und drei Dropouts (6 %) bei den nicht behandelten transgenen Tieren (TG-VEH). Der erste Exitus erfolgte vor dem Baseline-Scan und

vor Beginn der Vehikel-Therapie und war auf eine interstitielle Pneumonie viraler Genese zurückzuführen. Die zwei weiteren Dropouts traten im Alter von 17 und 17,5 Monaten ohne erkennbare Ursache auf. Die mit dem GSM therapierte Wildtyp-Gruppe (WT-GSM) wurde durch zwei Dropouts (4 %), nämlich einen bei Narkoseeinleitung des Baseline-Scans und einen weiteren bei Narkosebeginn des Follow-up 1-Scans auf zehn Mäuse dezimiert. In der mit Vehikel behandelten Wildtyp-Gruppe (WT-VEH) ergab sich ein Dropout (2 %) im Alter von 15 Monaten auf Grund einer interstitiellen Pneumonie. Der Verlauf der Tieranzahl ist in Tabelle 1 dargestellt.

Anzahl	TG-GSM	TG-VEH	WT-GSM	WT-VEH
Baseline (Juni 2013)	12	11	11	12
Follow-up 1 (Oktober 2013)	12	11	10	11
Follow-up 2 = finaler Scan (Dezember 2013)	11	09	10	11

Tabelle 1: Verlauf der Tieranzahl

Die unten stehende Tabelle 2 zeigt den Gewichtsverlauf der vier verschiedenen Gruppen im Laufe der sechsmonatigen Therapiestudie. Die APPswe-Mäuse waren zu Beginn der Therapie schwerer als die C57BL/6-Mäuse ($26,8 \pm 2,8$ g vs. $24,2 \pm 1,2$ g; $p < 0,001$). Es gab jedoch keinen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen den RO5506284- und den Vehikel-Gruppen innerhalb der APPswe-Mäuse bzw. der Wildtypen. TG-GSM wog zu Beginn im Mittel $27,2 \pm 3,2$ g, TG-VEH $26,4 \pm 2,4$ g, WT-GSM $24,6 \pm 1,1$ g und WT-VEH wog $24,2 \pm 1,1$ g. Im Mittelwert zeigten die transgenen Tiere eine weitgehende Gewichtskonstanz, wohingegen die Wildtypiere an Gewicht zulegten, wobei sie allerdings über den gesamten Studienzeitraum leichter als die transgenen Tiere blieben. Die WT-GSM-Gruppe steigerte sich von $24,6 \pm 1,1$ g im Juni auf $26,7 \pm 1,2$ g im Dezember und die WT-VEH-Gruppe von $24,2$

$\pm 1,1$ g auf $25,5 \pm 1,1$ g. Die mit GSM therapierten APP^{swe}-Tiere wogen im Dezember $27,7 \pm 2,6$ g und die mit Vehikel therapierten transgenen Mäuse $26,3 \pm 1,5$ g. Die beiden Vehikel-Gruppen hatten im Vergleich zur jeweiligen GSM-Gruppe zwar sowohl ein geringeres Start- als auch Endgewicht, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war. Die Differenz zwischen GSM- und Vehikel-Gruppe betrug im Dezember bei den transgenen Tieren 1,4 g und bei den Wildtyptieren 1,2 g. Ein Tier (Maus 07) aus der TG-GSM-Gruppe bildete eine Ausnahme, bei welchem sich das Gewicht von Juni auf Dezember um 4,1 g steigerte ($25,4$ g \rightarrow $29,5$ g), wobei auch eine deutliche Bauchumfangszunahme sichtbar wurde. Es handelte sich um die an einem abdominellen Lymphom verstorbene Maus. Bei der im Alter von 17 Monaten verstorbenen Maus (Maus 24) aus der transgenen Vehikel-Gruppe war ein Gewichtsverlust von 2,8 g auffällig ($32,0$ g \rightarrow $29,2$ g).

Gewicht	TG-GSM	TG-VEH	WT-GSM	WT-VEH
Juni	$27,2 \pm 3,2$ g	$26,4 \pm 2,4$ g	$24,6 \pm 1,1$ g	$24,2 \pm 1,1$ g
Oktober	$26,8 \pm 2,5$ g	$26,5 \pm 1,7$ g	$26,4 \pm 1,2$ g	$24,8 \pm 1,5$ g
Dezember	$27,7 \pm 2,6$ g	$26,3 \pm 1,5$ g	$26,7 \pm 1,2$ g	$25,5 \pm 1,1$ g

Tabelle 2: Gewichtsverlauf der vier Studiengruppen

3.2 Ergebnisse der μ PET-Scans

3.2.1 Visuelle Interpretation

Im Zuge des Baseline- und der zwei Follow-up-Scans wurden insgesamt 131 μ PET-Scans generiert. Die PVE-korrigierten Bilder zeigten zu Beginn der Studie in der TG-GSM-Gruppe gering höhere Signalintensitäten im Vergleich zur TG-VEH-Gruppe. Weder zwischen transgenen Tieren und Wildtyptieren noch zwischen GSM- und Vehikel-Gruppe der Wildtyptiere konnten visuell erfassbare Signalunterschiede beobachtet werden. Beim ersten Follow-up-Scan nach viermonatiger Therapie wurde

in der TG-VEH-Gruppe eine leichte Signalsteigerung im frontalen Kortex sichtbar. Die anderen drei Gruppen (TG-GSM, WT-GSM, WT-VEH) wiesen gegenüber dem Baseline-Scan keine Veränderung auf. Auch beim zweiten Follow-up-Scan nach sechsmonatiger Behandlung wurde in diesen drei Gruppen kein Unterschied zu den zwei vorangegangenen Scans bemerkt. Die TG-VEH-Gruppe zeigte beim dritten Scan eine deutliche [¹⁸F]-Florbetaben-PET-Signalsteigerung im frontalen Kortex, welche in Abbildung 9 rot dargestellt ist.

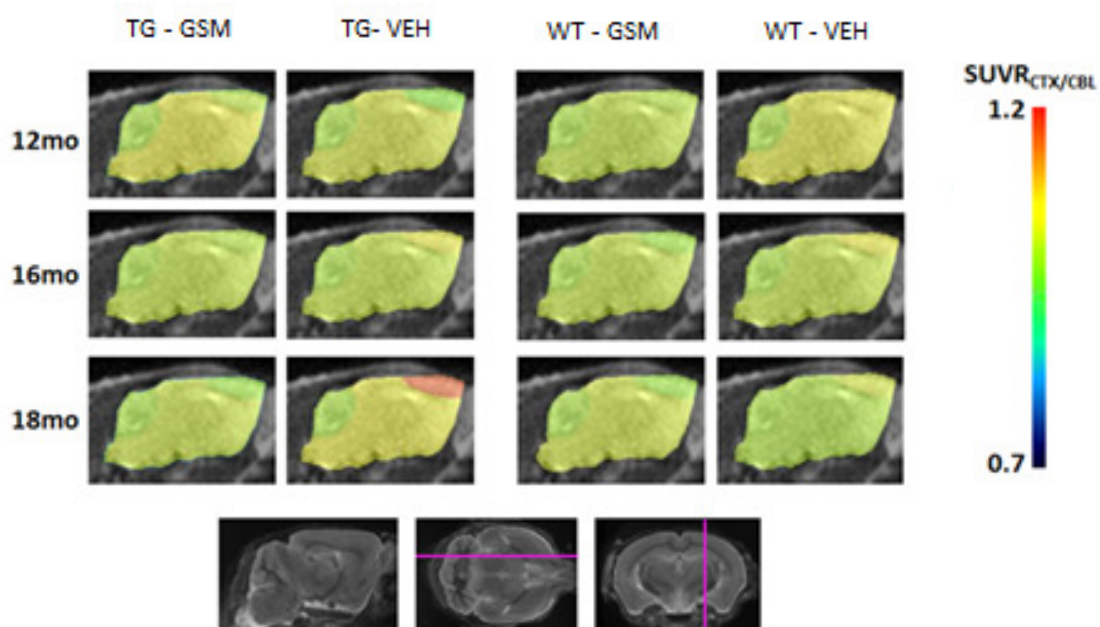


Abbildung 9: PVE-korrigierte Bilder der VOI-basierten PET-Analysen der vier Behandlungsgruppen zu den drei Scanzeitpunkten im Vergleich

3.2.2 Semiquantitative Analyse der transgenen Tiere

3.2.2.1. Verlauf der Einzelgruppen

Die Baseline-Scans zeigten in der Behandlungsgruppe einen $SUVR_{CTX/CBL}$ -Wert von $1,00 \pm 0,05$ und in der Vehikel-Gruppe einen $SUVR_{CTX/CBL}$ -Wert von $0,96 \pm 0,04$. Die $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werte der TG-GSM wiesen bei beiden Nachfolgescans keine signifikante Änderung auf. Beim ersten Follow-up-Scan ergab sich ein Wert von $1,01 \pm 0,06$ ($p = 0,67$ im Vergleich zur BL) und beim Scan nach sechsmonatiger Therapie

ein Wert von $1,03 \pm 0,10$ ($p = 0,63$ im Vergleich zu FU1; $p = 0,43$ im Vergleich zur BL). Die Vehikel-Gruppe hingegen zeigte Werte von $1,03 \pm 0,05$ ($p < 0,005$ im Vergleich zur BL) beim ersten Follow-up und $1,13 \pm 0,08$ ($p < 0,005$ im Vergleich zu FU1; $p < 0,001$ im Vergleich zur BL) beim finalen Scan. Prozentual ausgedrückt ergab sich bei der TG-GSM-Gruppe eine Zunahme um $1,7 \% \pm 3,9 \%$ von Baseline-Scan auf ersten Follow-up-Scan und von Baseline auf zweiten Follow-up betrug die Zunahme $2,6 \% \pm 6,1 \%$. Zwischen ersten und zweiten Follow-up-Scan wurde eine Zunahme von $0,9 \% \pm 6,5 \%$ berechnet. Die Vehikel-Gruppe legte bei der ersten Nachuntersuchung um $6,7 \% \pm 6,8 \%$ und bei der zweiten Nachuntersuchung um $17,1 \% \pm 6,9 \%$ in Bezug zum Baseline-Scan zu. Die Zunahme von ersten auf zweiten Follow-up-Scan betrug $10,1 \% \pm 9,7 \%$ (näheres s. Tabelle 3, S. 61).

3.2.2.2 Vergleich der GSM- und Vehikel-Gruppe

Zu Behandlungsbeginn bestand ein nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, wobei die Behandlungsgruppe mit einem $SUVR_{CTX/CBL}$ -Wert von $1,00 \pm 0,05$ einen um $4,2 \%$ höheren Wert als die Vehikel-Gruppe mit einem $SUVR_{CTX/CBL}$ -Wert von $0,96 \pm 0,04$ ($p = 0,11$) aufwies. Beim ersten Follow-up-Scan erreichte die Gruppe der therapierten Tiere einen $SUVR_{CTX/CBL}$ -Wert von $1,01 \pm 0,06$ und die Vehikel-Gruppe einen Wert von $1,03 \pm 0,05$, sodass ebenso wenig wie beim Baseline-Scan ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte ($p = 0,50$). Beim zweiten Follow-up ergab sich bei der Vehikel-Gruppe mit $1,13 \pm 0,08$ ein um $9,1 \%$ und damit signifikant höherer $SUVR_{CTX/CBL}$ -Wert als bei der Treatment-Gruppe mit $1,03 \pm 0,10$ ($p < 0,05$) (s. Abbildung 10). Durch den Vergleich der prozentualen Differenz zwischen den $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werten zweier Scans ($\Delta\%$ - $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werte) konnten die Unterschiede zwischen den Gruppen besser erfasst werden. Von Baseline-Scan auf den ersten Follow-up-Scan wurde eine Zunahme von $1,7 \% \pm 3,9$

% in der TG-GSM-Gruppe und von $6,7 \% \pm 6,8 \%$ in der TG-VEH-Gruppe ($p < 0,05$) registriert. Die Gegenüberstellung der Progression vom ersten Follow-up-Scan auf zweiten ergab eine Zunahme von $10,1 \% \pm 9,7 \%$ in der Vehikel-Gruppe und eine Progression von $0,9 \% \pm 6,5 \%$ in der GSM-Gruppe ($p < 0,05$). Von Baseline auf zweiten Follow-up zeigte sich in der Therapiegruppe eine Progression von $2,6 \% \pm 6,1 \%$ und in der Vehikel-Gruppe betrug diese $17,1 \% \pm 6,9 \%$ ($p < 0,001$) (s. Abbildung 11).

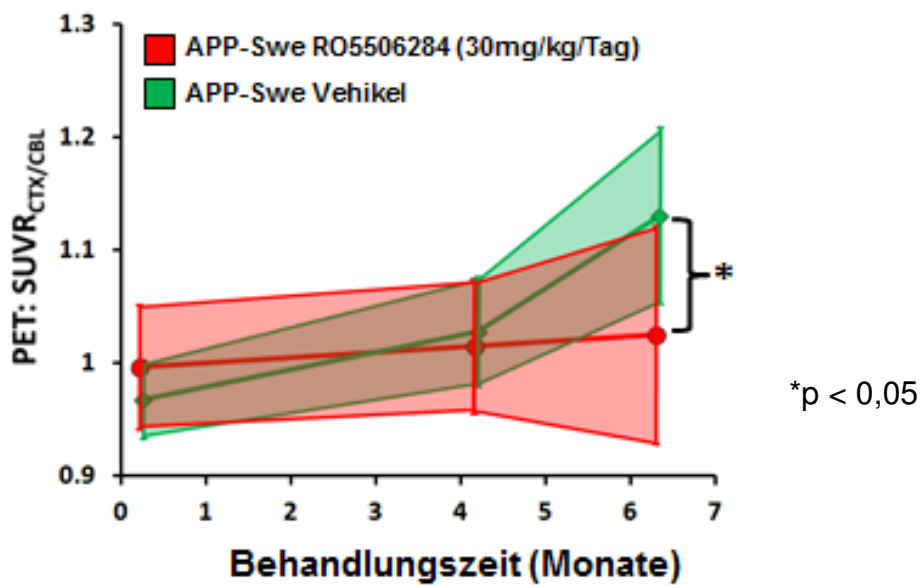


Abbildung 10: $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werte im Therapieverlauf sind für TG-GSM (rot) und für TG-VEH (grün) gezeigt. Die dicke Linie markiert den Mittelwert und die ausgefüllte Fläche repräsentiert die Standardabweichung.

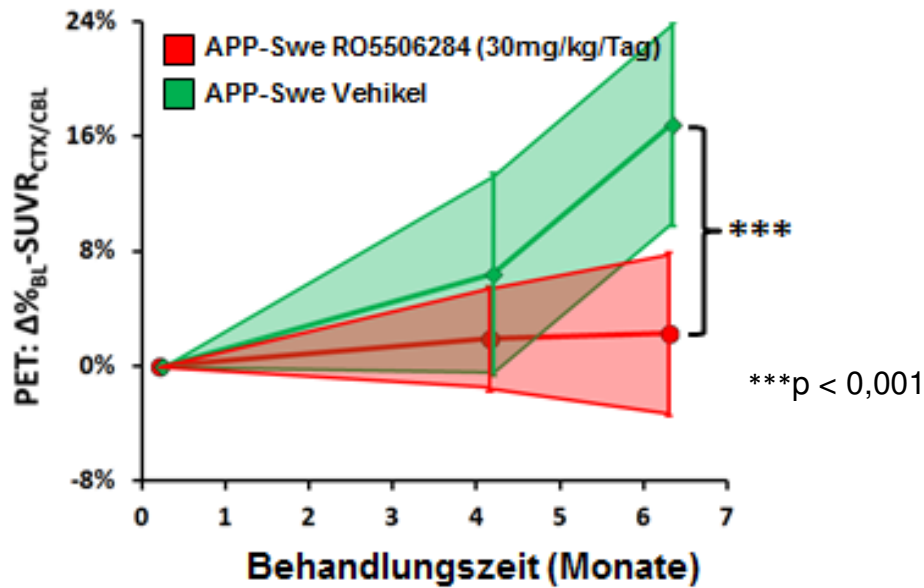


Abbildung 11: Der prozentuale Anstieg für FU1 und FU2 ist in Bezug zur individuellen Baseline für TG-GSM (rot) und TG-VEH (grün) dargestellt. Die dicke Linie markiert den Mittelwert und die ausgefüllte Fläche repräsentiert die Standardabweichung.

3.2.2.3 Exemplarische Betrachtung von Einzeltieren

Die Randomisierung der Tiere zu Beginn der Studie offenbarte erhöhte Baseline-SUVR_{CTX/CBL}-Werte bei drei der 12 Mäuse in der TG-GSM-Gruppe (markiert durch die Pfeile in Abbildung 12), woraus eine leicht erhöhte Gesamt-Baseline-SUVR_{CTX/CBL} in der TG-GSM-Gruppe im Vergleich zur TG-VEH-Gruppe resultierte (+4,2 %, $p = 0,11$). Es handelte sich hierbei um die Mäuse 01 (1,03), 05 (1,11) und 13 (1,07). Diese drei Tiere wiesen konstant bis zum finalen PET-Scan die höchsten Werte der behandelten transgenen Tiere auf: Maus 01 (1,15), Maus 05 (1,20) und Maus 13 (1,14). Maus 06 als Beispiel einer Maus mit initial niedrigem PET-Signal in der GSM-Gruppe hingegen zeigte sowohl zu Beginn als auch zum Ende der Studie eine sehr geringe Traceraufnahme: 0,96 im Baseline-Scan und 0,91 im zweiten Follow-up-Scan. Diese Beispieldaten heben die interindividuelle Variabilität zwischen den einzelnen Tieren sehr gut hervor, welche den Benefit des μ PET als nicht invasive Technik zur longitudinalen Bestimmung der Plaqueentwicklung im zeitlichen Verlauf

dieser Studie aufzeigt. Maus 21 zeigte als beispielhafter Vertreter der TG-VEH-Gruppe mit 0,93 als $SUVR_{CTX/CBL}$ -Wert beim Baseline-Scan und 1,18 beim Follow-up 2-Scan den höchsten Anstieg vom ersten auf den letzten PET-Scan und damit ein ungehindertes Fortschreiten der bildmorphologischen Korrelate der Alzheimer-Krankheit (s. Abbildung 13).

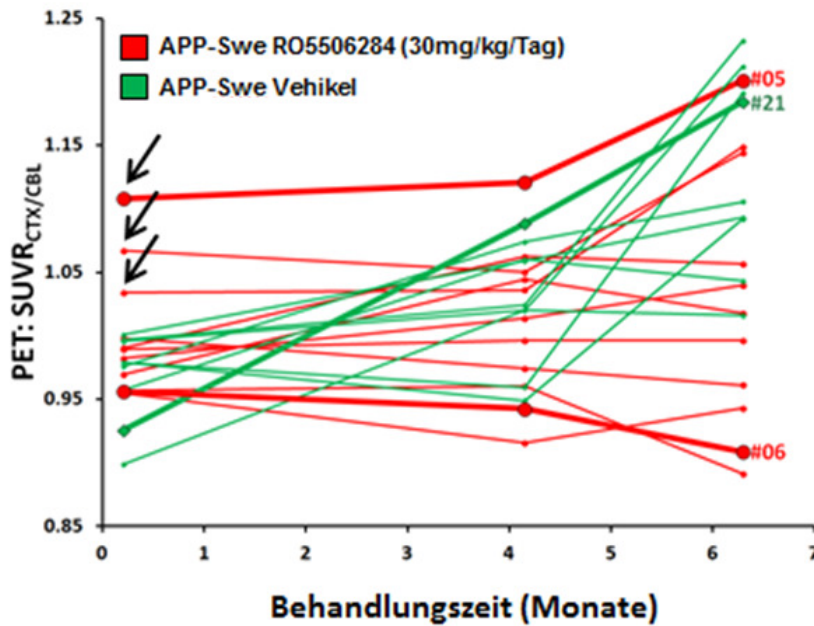


Abbildung 12: Verlauf der PET-Daten der einzelnen transgenen Tiere über den gesamten Studienzeitraum: Die Linien zeigen den individuellen longitudinalen Verlauf der $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werte für jede TG-GSM-Maus (rot) und jede TG-VEH-Maus (grün). Repräsentativ sind Maus 05 und 06 (TG-GSM) sowie Maus 21 (TG-VEH) hervorgehoben.

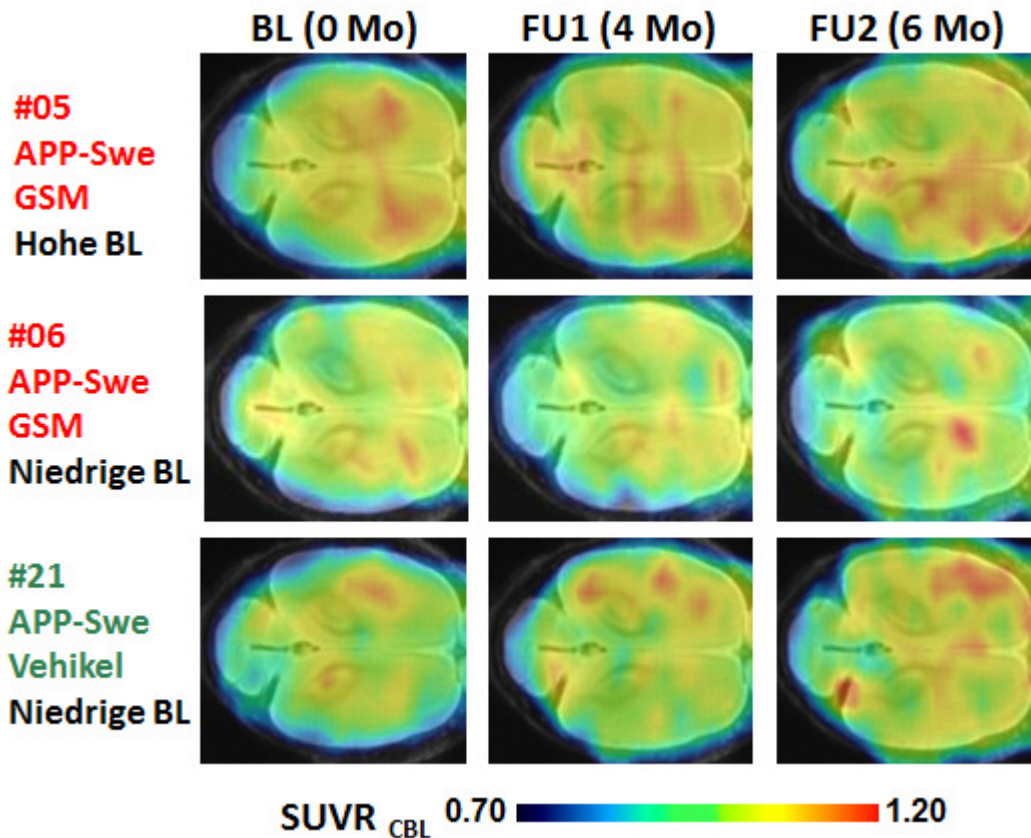


Abbildung 13: Axiale PET-Bilder (auf MRT Atlas fusioniert) von Maus 05, 06 und 21 als Beispieltiere zu den drei unterschiedlichen Scanzeitpunkten

3.2.2.4 Prädiktion von Baseline auf prozentualen Anstieg

Baseline-PET- $SUVR_{CTX/CBL}$ in den TG-GSM-Mäusen korrelierte gut mit $\Delta\%$ - $SUVR_{CTX/CBL}$ von BL auf FU2 ($R = 0,67$; $p < 0,05$) und den terminalen $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werten ($R = 0,90$; $p < 0,001$). Abbildung 14, welche die PET- $SUVR_{CTX/CBL}$ -Daten des Baseline-Scans aufgetragen gegen die prozentuale Zunahme der $SUVR_{CTX/CBL}$ -Daten von Baseline- auf finalen Scan darstellt, zeigt, dass Tiere der TG-GSM-Gruppe mit hohen Baseline- $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werten auch die höchste prozentuale Zunahme an Traceranreicherung aufwiesen. Maus 05, welche den höchsten Baseline-Wert (1,11) erzielte, hatte mit 8,4 % den zweiten höchsten Anstieg. Tiere, welche zu Beginn der Interventionsstudie eine geringe Plaqueload hatten, zeigten nur eine geringe Zunahme. Die TG-VEH-Kontrollgruppe zeigte zwischen Baseline-Scan und $\Delta\%$ - $SUVR_{CTX/CBL}$ von BL auf FU2 ($R = -0,04$; $p = n.s.$) keine Korrelation. So zeigte die

Maus 21 mit einer sehr geringen Traceraufnahme vor Behandlungsbeginn mit 28,2 % den höchsten prozentualen Anstieg ihrer Gruppe. Ebenso fiel die Korrelation zwischen Baseline-Scan und den terminalen $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werten in TG-VEH ($R = 0,44$; $p = n.s.$) sehr gering aus.

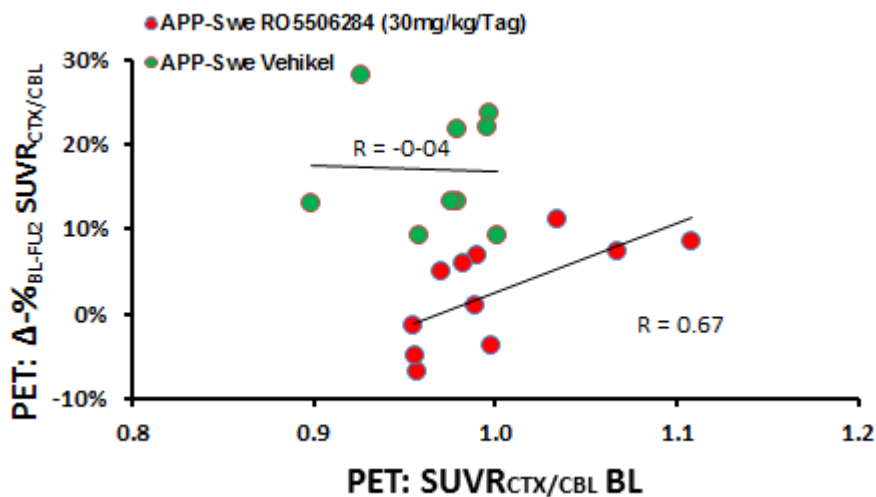


Abbildung 14: Korrelation zwischen $SUVR_{CTX/CBL}$ im Baseline-Scan und $\Delta\%_{BL-FU2}$ von Baseline- auf Follow-up 2-Scan in TG-GSM (rot) und TG-VEH (grün): hohe Baseline-Ausgangswerte der TG-GSM-Gruppe gehen mit einer starken Zunahme der Traceranreicherung im Studienverlauf einher

3.2.3 Semiquantitative Analyse der Wildtypmäuse

3.2.3.1 Verlauf der Einzelgruppen

Die Wildtypmäuse blieben sowohl in der GSM-Gruppe als auch in der Vehikel-Gruppe annähernd konstant. Bei den behandelten Tieren ließ sich eine geringe Abnahme der $SUVR_{CTX/CBL}$ -Daten beginnend mit $1,02 \pm 0,05$ beim Baseline-Scan über $1,00 \pm 0,06$ ($p = 0,35$ im Vergleich zur BL) bei FU1 bis hin zu $0,99 \pm 0,06$ ($p = 0,78$ im Vergleich zu FU1; $p = 0,23$ im Vergleich zur BL) bei FU2 feststellen. Daraus ergibt sich eine Abnahme um $2,1 \% \pm 2,9 \%$ von Baseline auf FU1, um $2,6 \% \pm 3,3 \%$ von Baseline auf FU2 und eine Abnahme um $0,3 \% \pm 2,9 \%$ von FU1 auf FU2. Die Mäuse mit Vehikel zeigten einen stabilen Verlauf mit $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werten von $1,01 \pm$

0,06 beim Baseline-Scan, $1,03 \pm 0,04$ bei FU1 ($p = 0,36$ im Vergleich zur BL) und $1,02 \pm 0,04$ ($p = 0,67$ im Vergleich zu FU1; $p = 0,54$ im Vergleich zur BL) bei FU2. Prozentual betrachtet ergibt sich von Baseline auf FU1 eine Zunahme von $2,6 \% \pm 3,9 \%$, von Baseline auf FU2 eine Zunahme von $2,0 \% \pm 3,6 \%$ und von FU1 auf FU2 eine Abnahme von $0,7 \% \pm 2,7 \%$.

3.2.3.2 Vergleich der GSM und Vehikel Gruppe

Es bestand zu keinem der drei Messzeitpunkte ein signifikant nachweisbarer Unterschied in der kortikalen Signalanreicherung im PET zwischen therapierten und nicht therapierten Tieren. Beim Baseline-Scan wurden in der GSM-Gruppe $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werte von $1,02 \pm 0,05$ und in der Vehikel-Gruppe Werte von $1,01 \pm 0,06$ ($p = 0,69$) gemessen. Beim ersten Follow-up-Scan wurden für die GSM-Gruppe Werte von $1,00 \pm 0,06$ und für die Kontrollgruppe Werte von $1,03 \pm 0,04$ ($p = 0,12$) ermittelt. Die $SUVR_{CTX/CBL}$ für die Gruppe der therapierten Mäuse betrug beim FU2-Scan $0,99 \pm 0,06$ und für die Vehikel-Tiere $1,02 \pm 0,04$ ($p = 0,13$). Auch der Vergleich der $\Delta\%$ - $SUVR_{CTX/CBL}$ -Werte lieferte keine statistische Signifikanz. Beim Vergleich von Baseline auf FU1 ergab sich eine Abnahme von $2,1 \% \pm 2,9 \%$ in der WT-GSM-Gruppe und eine Zunahme von $2,6 \% \pm 3,9 \%$ in der WT-VEH-Gruppe ($p = 0,14$). Von Baseline auf zweiten Follow-up-Scan wurde in der GSM-Gruppe eine Abnahme um $2,6 \% \pm 3,3 \%$ und in der Vehikel-Gruppe eine Zunahme um $2,0 \% \pm 3,6 \%$ ($p = 0,28$) beobachtet. Für die Progression zwischen FU1 und FU2 wurde in der Therapiegruppe eine Abnahme um $0,3 \% \pm 2,9 \%$ und in der Vehikel-Gruppe eine Abnahme um $0,7 \% \pm 2,7 \%$ ($p = 0,90$) ermittelt.

3.3 Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen

Zur Bestätigung der *in vivo*-Ergebnisse wurde zu Studienende eine Methoxy-X04-Färbung des fibrillären β -Amyloids jeweils einer Hemisphäre durchgeführt. Weder für

die Plaqueload (-6,3 %, $p = 0,85$) noch für die Plaquedichte (-22,5 %, $p = 0,42$) noch für die Ratio aus Dichte/Load (-18,5 %, $p = 0,27$) konnte jedoch bei reiner Betrachtung der terminalen Daten zwischen TG-GSM und TG-VEH ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Plaqueload der mit RO5506284 therapierten Mäuse lag bei $3,4 \pm 1,0$ % und der transgenen Kontrollgruppe bei $3,6 \pm 0,6$ %. Die Plaquedichte der TG-GSM betrug $70,3 \pm 21,2$ N/mm³ und der TG-VEH $90,7 \pm 11,3$ N/mm³. In der Therapiegruppe war das Verhältnis Dichte/Plaqueload $21,6 \pm 3,5$ und in der Vehikel-Gruppe $26,6 \pm 2,5$. Nach Inkludierung der Baseline als Kovariable (COVAR) (s. Abbildung 15) ergaben sich sowohl für die Plaqueload (-42 %; $p < 0,05$) als auch die Plaquedichte (-48,3 %; $p < 0,05$) statistisch signifikante Unterschiede zwischen TG-GSM und TG-VEH. Plaqueload und Plaquedichte korrelierten hoch miteinander ($R = 0,98$ für TG-GSM; $R = 0,75$ für TG-VEH). Die Plaqueload der TG-GSM-Gruppe war mit einer vergleichsweise niedrigen Plaquedichte assoziiert und dies insbesondere in Tieren mit einer hohen Plaqueload. Die Plaquedichte der TG-VEH-Gruppe war in Bezug auf deren Plaqueload höher als bei der TG-GSM-Gruppe (s. Abbildung 16). Die Darstellung in einem Histogramm verdeutlichte zudem, dass in den Hemisphären der TG-GSM weniger kleine Plaques, dafür jedoch mehr große Plaques als in TG-VEH gefunden wurden (s. Abbildung 17). Dies zeigt den hemmenden Einfluss des GSM RO5506284 primär auf die Amyloidoneogenese. Das Wachstum bereits bestehender Plaques wird hingegen weniger beeinflusst.

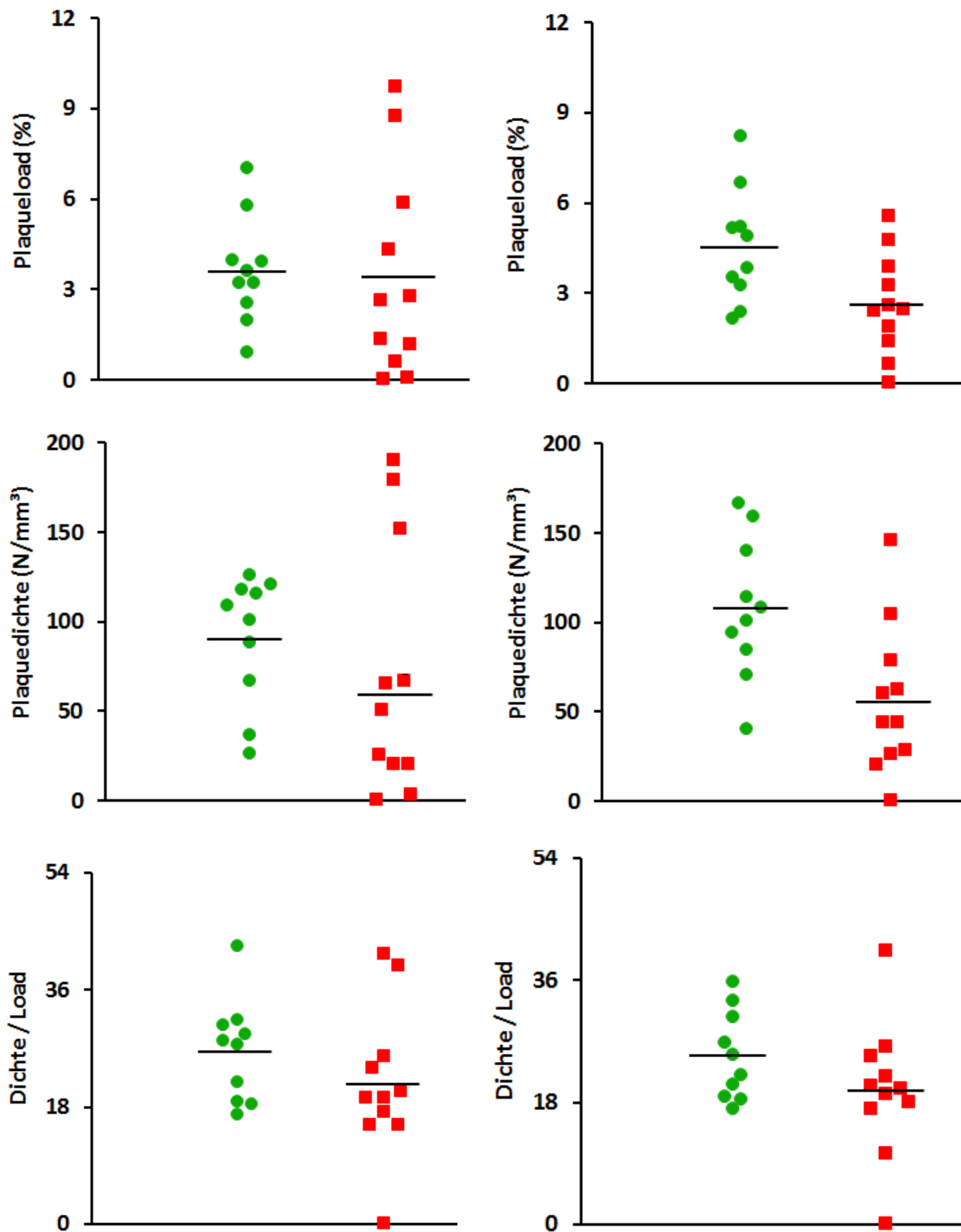


Abbildung 15: Gegenüberstellung der verschiedenen histopathologischen Parameter (Plaque load, Plaque dichte und Dichte/Load) von TG-GSM (rot) und TG-VEH (grün): links ohne Inkludierung der Baseline als Kovariable (COVAR); rechts mit COVAR

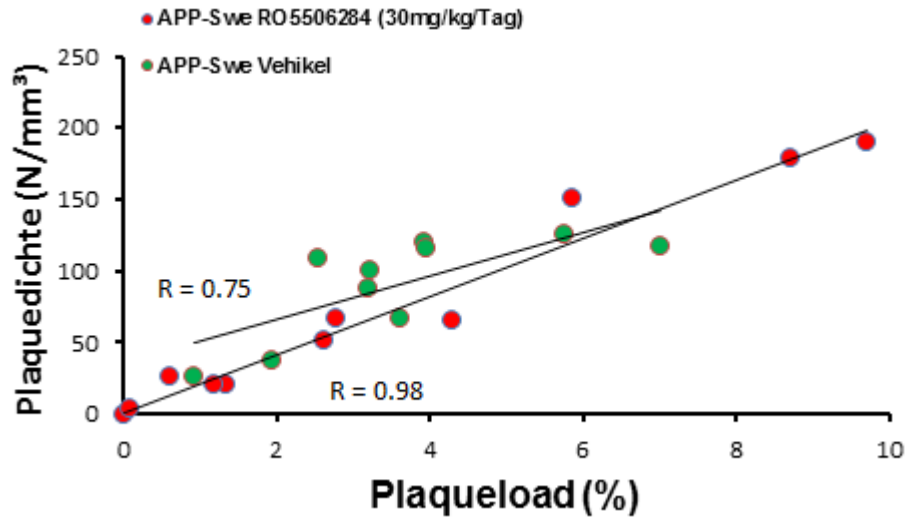


Abbildung 16: Korrelation von Plaqueload und Plaquedichte (ohne COVAR)

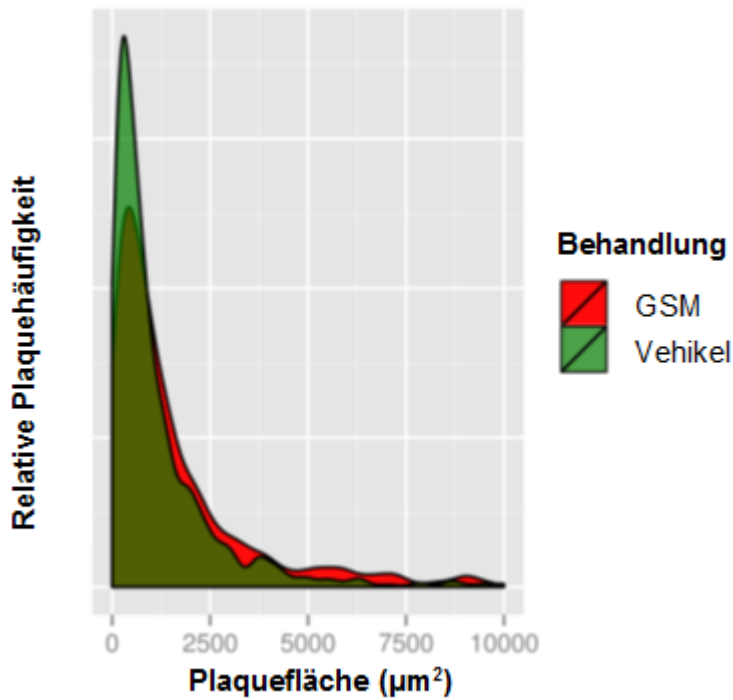


Abbildung 17: Histogramm der Plauegröße: Die Gegenüberstellung von relativer Plauehäufigkeit und der von den Amyloid Plaues eingenommenen Fläche zeigt wenig kleine, jedoch mehr große Plaues in TG-GSM (rot) und viele kleine Plaues in TG-VEH (grün).

3.4 Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen

3.4.1 Lösliches Amyloid

Die Mittelwerte der TG-GSM-Gruppe betragen pro Hemisphäre $0,44 \pm 0,16$ ng/ml für A β 38 (+59 %; $p = 0,38$), $5,38 \pm 1,87$ ng/ml für A β 40 (+61 %; $p = 0,35$), $1,09 \pm 0,39$ ng/ml für A β 42 (+26 %; $p = 0,63$) und $6,90 \pm 2,4$ ng/ml für das Gesamt-A β (+54 %; $p = 0,39$). Die A β 42/A β 40 Ratio betrug $0,13 \pm 0,03$ (-46 %; $p < 0,01$). Bei der TG-VEH-Gruppe wurden für die Fraktion des löslichen A β mittels DEA Werte von $0,28 \pm 0,08$ ng/ml für A β 38, von $3,35 \pm 0,85$ ng/ml für A β 40, von $0,86 \pm 0,21$ ng/ml für A β 42 und von $4,49 \pm 1,14$ ng/ml für die Gesamtheit der A β -Peptide ermittelt (s. Abbildung 18). Das Verhältnis von A β 42 zu A β 40 betrug $0,25 \pm 0,02$. Abbildung 19 veranschaulicht sowohl für TG-GSM die prozentuale Verteilung von A β 38 (-29 %; $p = 0,13$), A β 40 (+13 %; $p < 0,05$) und A β 42 (-44 %; $p < 0,001$) als auch für TG-VEH.

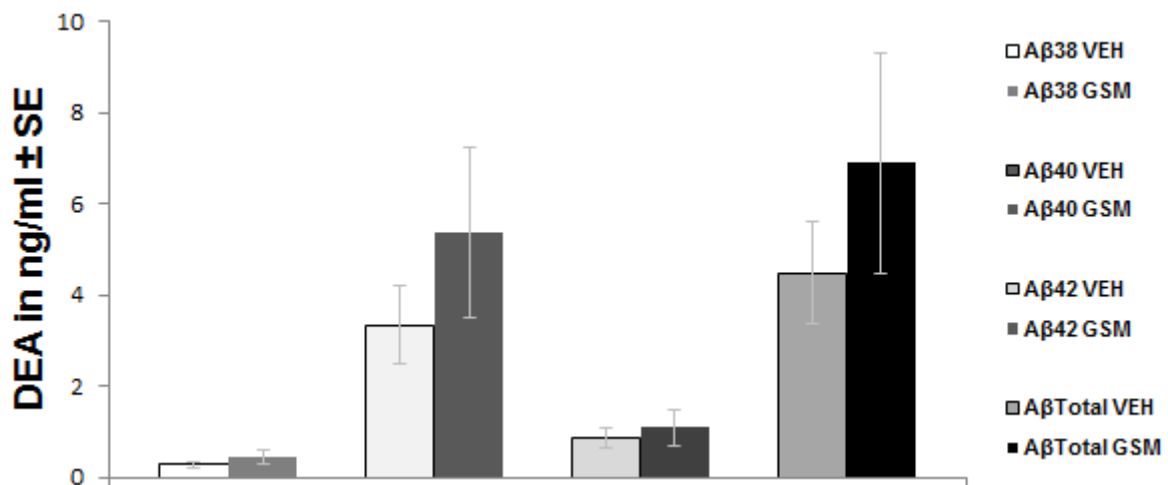


Abbildung 18: Absolutwerte der löslichen Amyloidfraktionen für TG-GSM und TG-VEH

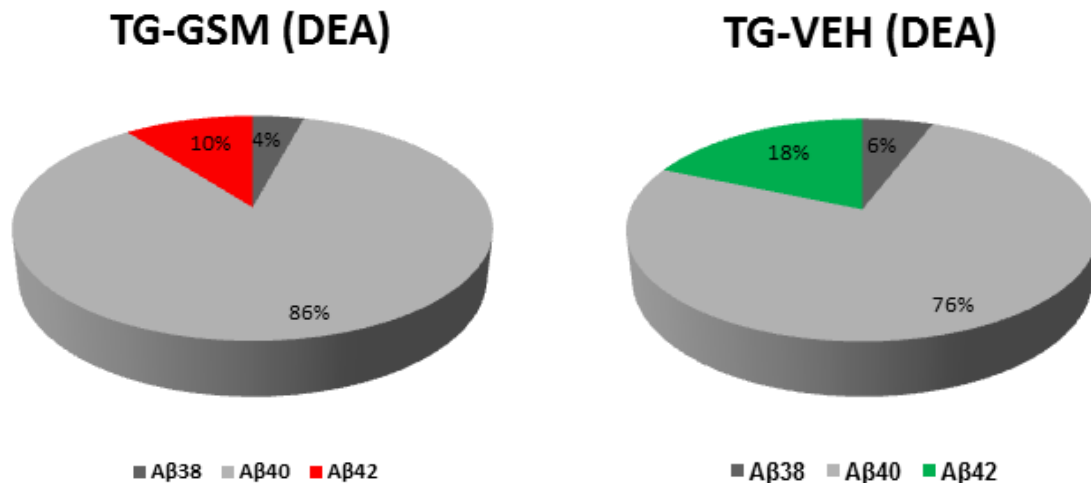


Abbildung 19: prozentuale Verteilung der löslichen Aβ-Peptide in Bezug auf Gesamt-Aβ

3.4.2 Unlösliches Amyloid

Die durch UREA bestimmten Plaque-gebundenen und somit unlöslichen Peptide der TG-GSM-Gruppe betragen für Aβ38 14 ± 4 ng/ml (+11 %; $p = 0,78$), für Aβ40 146 ± 50 ng/ml (+6 %; $p = 0,89$), für Aβ42 39 ± 10 ng/ml (-40 %; $p < 0,05$) und für das Gesamt-Aβ 198 ± 63 ng/ml (-8 %; $p = 0,82$). Das Verhältnis von Aβ42 zu Aβ40 ergibt $0,40 \pm 0,04$ (-39 %; $p = 0,15$). In der TG-VEH-Gruppe ergeben sich für Aβ38 eine Menge von 11 ± 2 ng/ml, für Aβ40 eine Anzahl von 138 ± 24 ng/ml, für Aβ42 von 65 ± 5 ng/ml und für die Gesamtanzahl der Peptide eine Menge von 214 ± 28 ng/ml (s. Abbildung 20). Die Ratio aus Aβ42 zu Aβ40 beträgt $0,70 \pm 0,20$. Abbildung 21 zeigt sowohl für TG-GSM die prozentuale Verteilung der β-Amyloide an der Gesamtmenge für Aβ38 (+21 %; $p < 0,05$), für Aβ40 (+11 %; $p = 0,14$) und Aβ42 (-23 %; $p = 0,11$) als auch für TG-VEH. Nach Inkludierung der Baseline als Kovariable (s. Abbildung 22) ergibt sich für die Aβ42-Last als einzige ein hoch signifikantes Ergebnis (-56 %; $p < 0,001$) zwischen den beiden Gruppen. In der TG-GSM-Gruppe beträgt die Aβ42-Last 32 ± 6 ng/ml und in der TG-VEH Gruppe 73 ± 6 ng/ml. Die Aβ38-Level der TG-GSM-Gruppe (10 ± 2 ng/ml; -33 %; $p = 0,12$), die Aβ40-Level (116 ± 33 ng/ml; -33 %;

p = 0,21) und die Gesamtmenge der β -Peptide (158 ± 40 ng/ml; -40 %; p = 0,07) sind in der TG-GSM-Gruppe nicht signifikant niedriger als in der TG-VEH-Gruppe, in welcher A β 38 15 ± 2 ng/ml, A β 40 174 ± 30 ng/ml und Gesamt-A β 261 ± 35 ng/ml betragen.

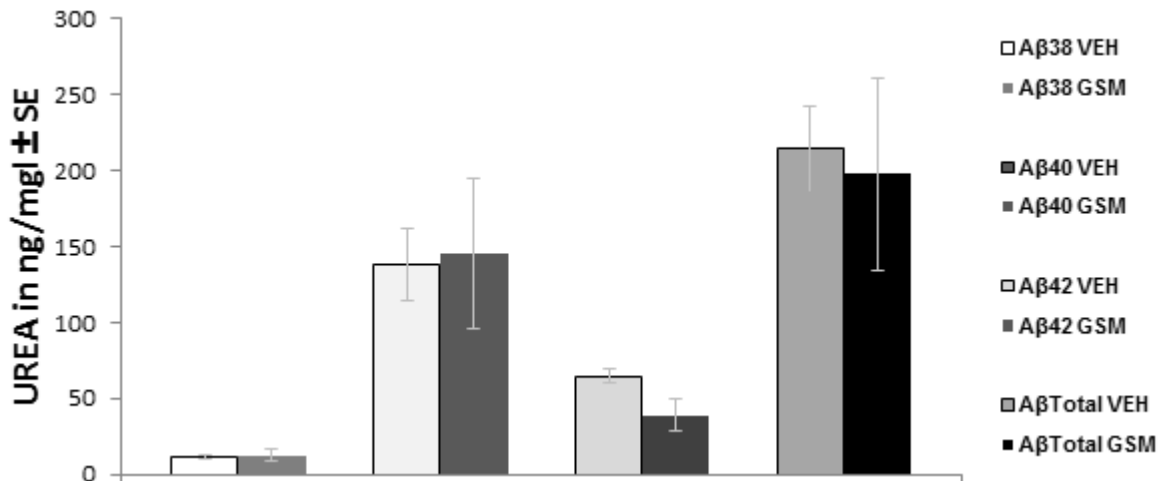


Abbildung 20: Absolutwerte der unlöslichen Amyloidfraktionen für TG-GSM und TG-VEH

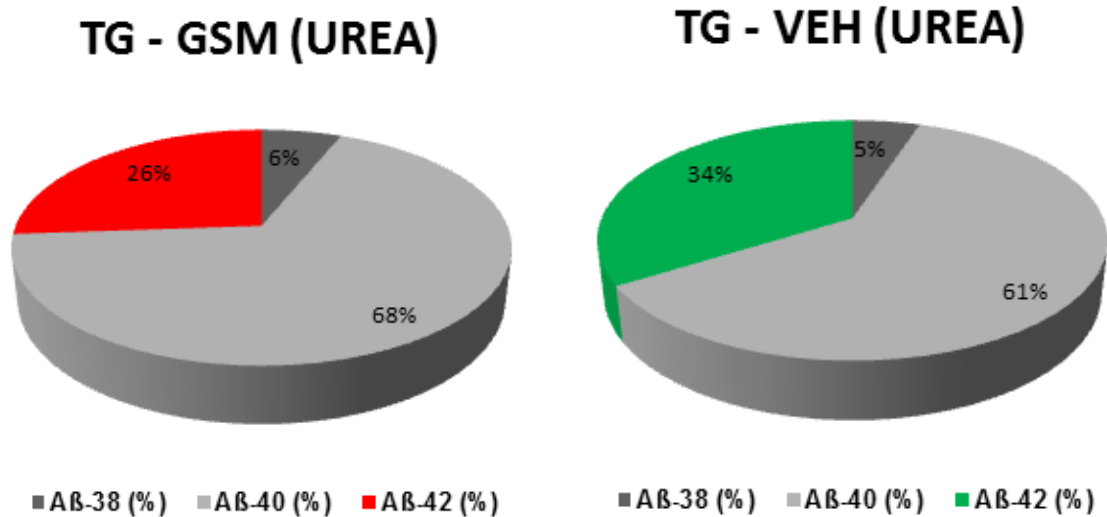


Abbildung 21: prozentuale Verteilung der unlöslichen A β -Peptide in Bezug auf Gesamt-A β

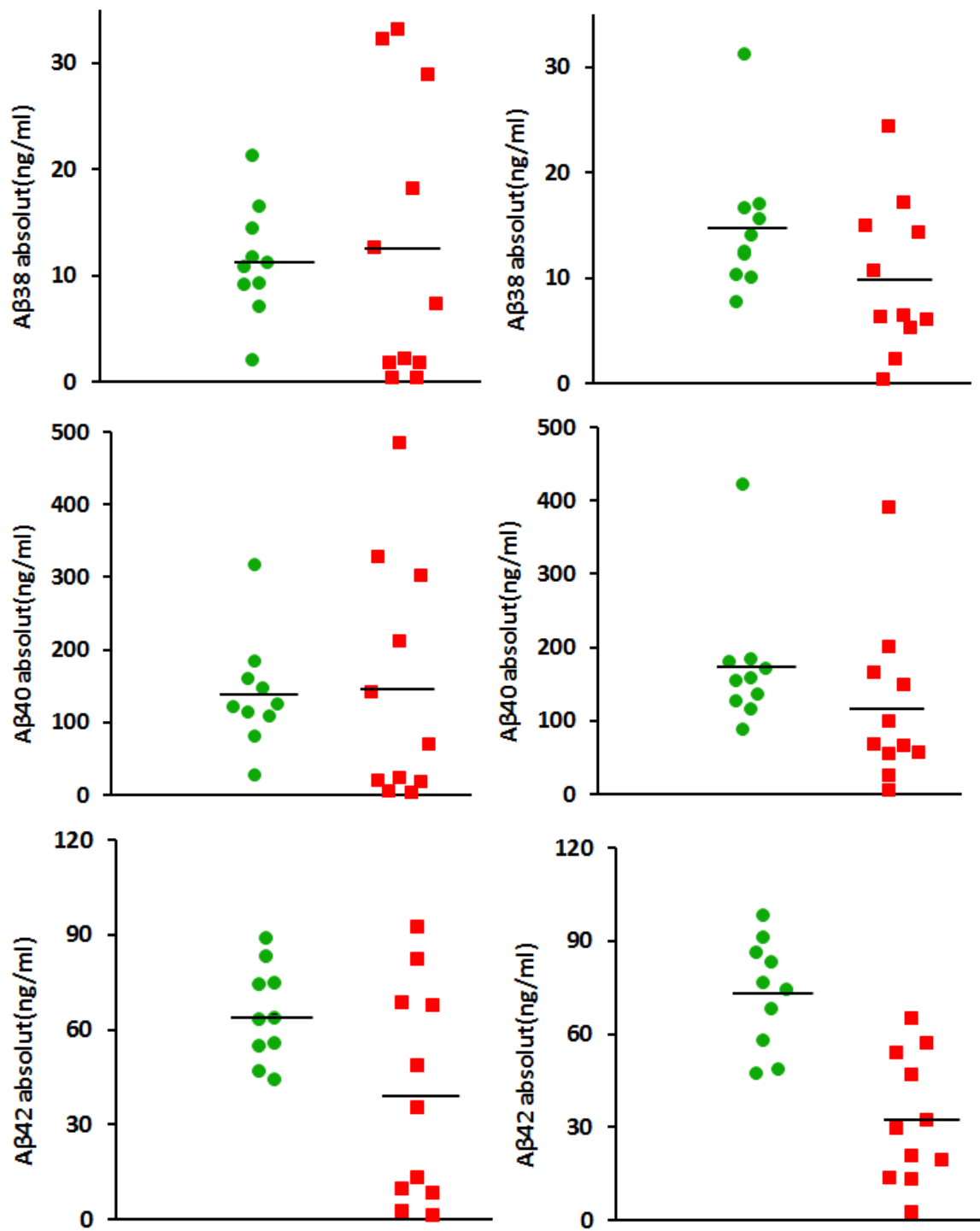


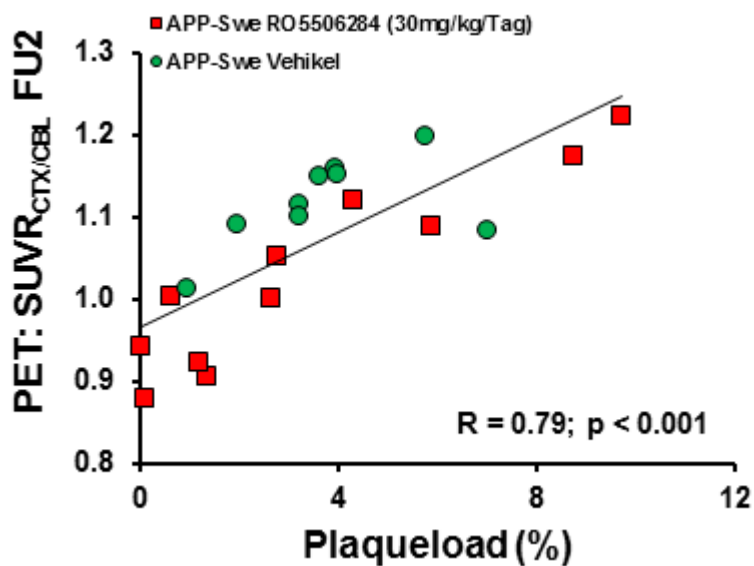
Abbildung 22: Gegenüberstellung der verschiedenen Aβ-Fractionen von TG-GSM (rot) und TG-VEH (grün): links ohne Inkludierung der Baseline als Kovariable (COVAR); rechts mit COVAR

3.5 Zusammenschau der Modalitäten

Es wurden jeweils die Baseline-korrigierten Werte für Plaqueload, Plaquedichte und unlösliches A β 42 bei der Bestimmung des Pearsons-Korrelationskoeffizienten verwendet.

3.5.1 Korrelation zwischen PET und Histopathologie

Die aufgeführte Abbildung 23 veranschaulicht die Korrelation der histologisch ermittelten Plaqueload und der Plaquedichte mit den terminalen $SUVR_{CTX/CBL}$ -Daten der zugehörigen Hemisphäre. Die Korrelation zwischen Plaqueload und FU2 beträgt $R = 0,79$ ($p < 0,001$) und zwischen Plaquedichte und FU2 $R = 0,84$ ($p < 0,001$).



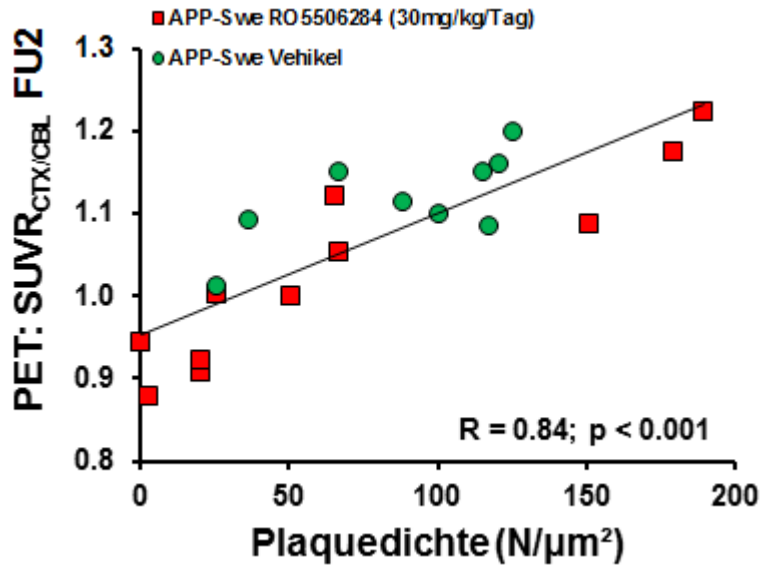


Abbildung 23: Korrelation von Plaqueload bzw. Plaquedichte mit finalem PET in der transgenen Tiergruppe (entsprechende Hemisphäre): eine niedrigere Plaqueload bzw. Plaquedichte der TG-GSM geht mit einem niedrigeren PET-Signal einher

3.5.2 Korrelation zwischen PET und Biochemie

Für die transgenen Tiere beträgt der Pearsons-Korrelationskoeffizient zwischen Baseline-korrigiertem unlöslichem A β ₄₂ und SUVR_{CTX/CBL} des finalen PET-Scans der entsprechenden Hemisphäre R = 0,83 (p < 0,001).

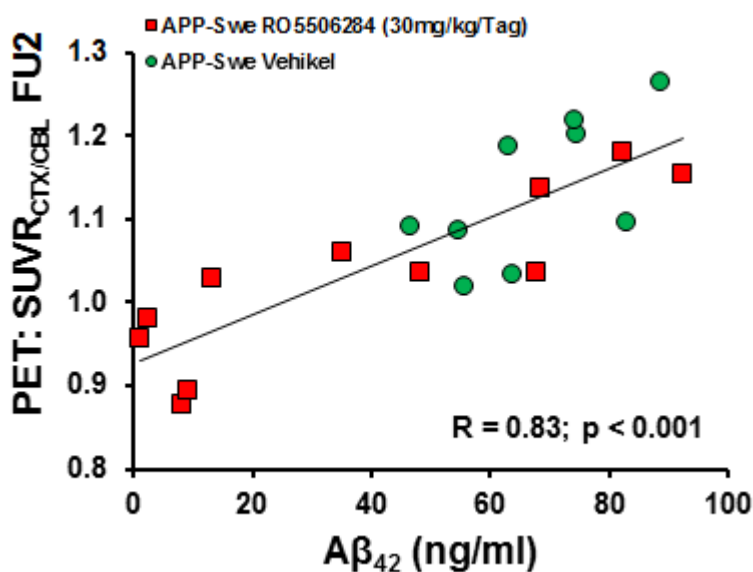


Abbildung 24: Korrelation von UREA-A β 42 absolut und terminalen Scan (entsprechende Hemisphäre): geringere A β 42-Werte der TG-GSM-Gruppe gehen mit einem niedrigeren PET-Signal einher

3.5.3 Korrelation zwischen Biochemie und Histopathologie

Die Korrelation sowohl zwischen Plaqueload als auch Plaquedichte mit dem unlöslichen A β 42 ist sehr hoch (R = 0,77 für Plaqueload, R = 0,81 für Plaquedichte). Hierbei werden Werte aus den jeweils kontralateralen Hemisphären miteinander korreliert.

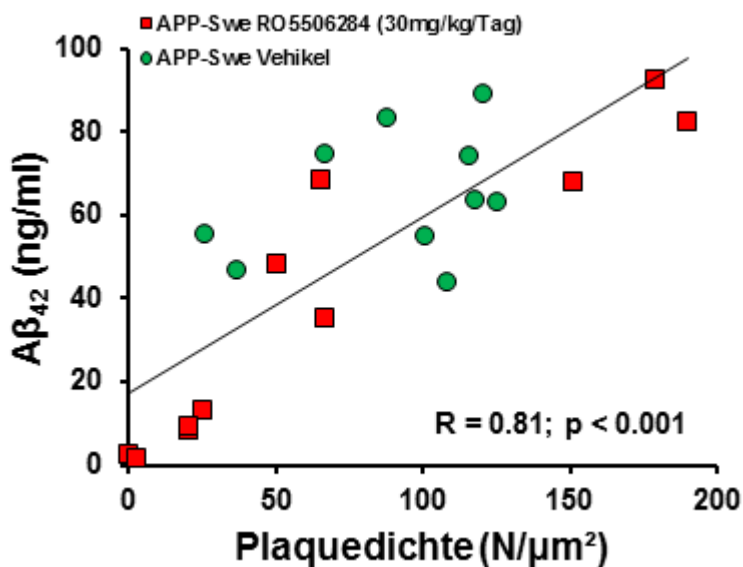
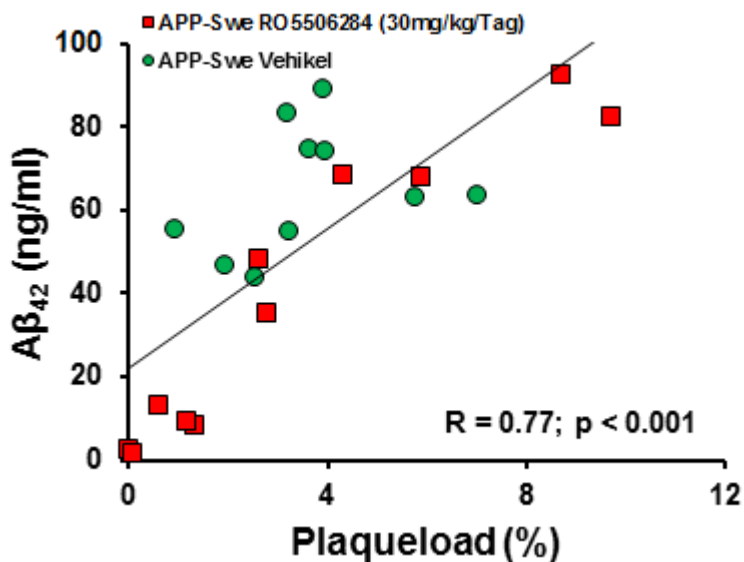


Abbildung 25: Korrelation zwischen Plaqueload bzw. Plaquedichte und unlöslichem A β 42

Studien- gruppe	Alter Monate (Scan)	Gewicht $\theta \pm SD$	PET-Bildgebung				Histologie				Biochemie																										
			N	SUV _{CTx/CKD} $\pm SD$	$\Delta\%$ -SUV _{CTx/CKD} $\pm SD$ vs. BL	$\Delta\%$ -SUV _{CTx/CKD} $\pm SD$ vs. FU1	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)	Plaqueload (% Fläche $\pm SEM$)																			
APP-Swe (RO5506284)	12 (BL)	27,2 \pm 3,2	12	1,00 \pm 0,05																																	
	16 (FU1)	26,8 \pm 2,5	12	1,01 \pm 0,06	+1,7 \pm 3,9%																																
	18 (FU2)	27,7 \pm 2,6	11	1,03 \pm 0,10*	+2,6 \pm 6,1%***	+0,9 \pm 6,5%*																															
APP-Swe (Vehikel)	12 (BL)	26,4 \pm 2,4	11	0,96 \pm 0,04																																	
	16 (FU1)	26,5 \pm 1,7	11	1,03 \pm 0,05	+6,7 \pm 6,8%																																
	18 (FU2)	26,3 \pm 1,5	9	1,13 \pm 0,08	+17,1 \pm 6,9%	+10,1 \pm 9,7%																															
C57BL/6 (RO5506284)	12 (BL)	24,6 \pm 1,1	11	1,02 \pm 0,05																																	
	16 (FU1)	26,4 \pm 1,2	10	1,00 \pm 0,06	-2,1 \pm 2,9%																																
	18 (FU2)	26,7 \pm 1,2	10	0,99 \pm 0,06	-2,6 \pm 3,3%	-0,3 \pm 2,9%																															
C57BL/6 (Vehikel)	12 (BL)	24,2 \pm 1,1	12	1,01 \pm 0,06																																	
	16 (FU1)	24,8 \pm 1,5	11	1,03 \pm 0,04	+2,6 \pm 3,9%																																
	18 (FU2)	25,5 \pm 1,1	11	1,02 \pm 0,04	+2,0 \pm 3,6%	-0,7 \pm 2,7%																															

Tabelle 3: Übersicht über PET-, Histopathologie- und Biochemieergebnisse: (*) statistisch signifikant mit p < 0,05; (***) statistisch signifikant mit p < 0,001

4. Diskussion

Bei dem durchgeführten Therapieversuch mit dem Gamma-Sekretase-Modulator RO5506284 handelte es sich um eine longitudinale PET-kontrollierte präklinische Langzeit-Therapiestudie der zerebralen Amyloidose an APP^{swe}-Mäusen. Zur Cross-Validierung schloss sich nach Studienende eine histopathologische und biochemische Untersuchung der Hirnhemisphären an. In der Zusammenschau der verschiedenen Modalitäten konnte eine Verlangsamung der Amyloidogenese unter der Therapie gezeigt werden.

4.1 Interindividuelle Unterschiede/Varianz der AD-Mausmodelle

Da es mittlerweile zahlreiche Mausmodelle gibt, welche sich sowohl in der Anzahl als auch der Wahl der veränderten Gene, der Promotoren und der verwendeten Ursprungsrassen unterscheiden, bewirken diese Faktoren eine unterschiedliche Pathologie der verschiedenen Mausmodelle (Duyckaerts, Potier et al. 2008), wodurch sich auch klare Unterschiede in Aussehen, in der Struktur und der Menge der A β -Plaques der verschiedenen Mausmodelle (Snellman, Lopez-Picon et al. 2013) ergeben. Auch die Verwendung von unterschiedlichen Radiotracer und Studiendesigns erschwert den Vergleich zwischen verschiedenen Studien und Mausmodellen. Anschaulich wird dies an drei verschiedenen Studien von Klunk et al, 2005, Manook et al, 2012 und Snellman et al, 2013. Bei allen drei Forschungsgruppen wurde der Tracer [¹¹C]-PIB und jeweils ein unterschiedliches doppelt transgenes Mausmodell mit einer Mutation im APP-Gen und einer Mutation im Presinilin 1-Gen verwendet. Klunk et al. verfügten über ein aus männlichen Tg2576- (K670N/M671L) und weiblichen M146L-PS1-transgenen Tieren gezüchtetes PS1/APP-Mausmodell, bei welchem im PET kein signifikanter Unterschied zu den PS1-Wurfgeschwistern, welche als Kontrolltiere dienten, festgestellt werden konnte.

Als Erklärung wurden durch in vitro-Bindungsstudien im Mausmodell weniger hoch affine Bindungsstellen für den Radiotracer als beim AD-Patienten gefunden (Klunk, Lopresti et al. 2005). Für die von Manook et al. verwendeten APP/PS1-Mäuse (B6; CB-Tg(thy1-PSEN1*M146V/Thy1-APP*swe)-10Arte) konnte im [¹¹C]-PIB-PET eine deutlich höhere Aktivitätsretention als bei den Kontrolltieren beobachtet werden, welche mittels Autoradiographie und Biodistribution bestätigt wurde (Manook, Yousefi et al. 2012). Snellman et al. konnten bei APP_{swe}-PS1_{ΔE9}-Versuchstieren wenig Plaques im PET detektieren, wohingegen die Histochemie eine hohe Plaqueanzahl lieferte (Snellman, Lopez-Picon et al. 2013). Die ebenso von Snellman et al. untersuchten einfach transgenen APP23-Mäuse zeigten im Alter von 18 Monaten einen deutlichen Anstieg der [¹¹C]-PIB-Retention im Gehirn. Im Gegensatz zu Maeda et al., welcher ebenfalls APP23-Tiere mit [¹¹C]-PIB scannte und dabei eine sehr hohe spezifische Aktivität von 291 ± 10,3 GBq/μmol verwenden musste, um eine signifikante Traceranreicherung in den Aβ-Plaques zu erreichen (Maeda, Ji et al. 2007), reichte bei Snellman et al. eine mittlere spezifische Aktivität von 100 ± 27 GBq/μmol aus. Bei den ebenso von Snellman gescannten einfach transgenen Tg2576-Mäusen konnte zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine vermehrte Radiotraceraufnahme gezeigt werden (Snellman, Lopez-Picon et al. 2013). Auch Toyama et al. scheiterten bei dem Versuch, mittels des Tracers ¹¹[C]-6-OH-BTA-1 bei Tg2576-Tieren eine vermehrte Bindung an Aβ-Plaques festzustellen. Als Erklärung wurde ebenso wie bei Klunk et al. eine im Vergleich zum an AD erkrankten Menschen verringerte Bindungsaffinität und weniger Bindungsstellen für den Tracer angegeben (Toyama, Ye et al. 2005). Daraus lässt sich ableiten, dass Tg2576-Tiere möglicherweise nicht für die Anwendung zum Therapiemonitoring in longitudinalen Interventionsstudien geeignet sind, APP23-Mäuse hingegen ein geeignetes Modell darstellen. Ein weiteres verwendbares Mausmodell stellt das Modell mit der APP_{swe}

-Mutation dar, welches Rominger et al. zur Plaquetdetektion mit dem neuen Tracer [¹⁸F]-Florbetaben erfolgreich verwendeten. Im Alter von 20 Monaten konnte bei den Tieren im Vergleich zum Baseline-Scan mit 13 Monaten eine 16-prozentige Zunahme der SUVR_{CTX/CBL}-Werte ermittelt werden (Rominger, Brendel et al. 2013). In der aktuellen Therapiestudie wurde eine erhöhte interindividuelle Variabilität bzgl. der prozentualen Plaqueload der verschiedenen Tiere in jeder der vier Studiengruppen beobachtet. Bei Verwendung eines doppelt oder dreifach transgenen Mausmodells könnten durch die schnellere und ausgedehntere Entwicklung der Plaqueload die interindividuellen Unterschiede geringer ausfallen. Zudem würde eine schnellere Plaqueentstehung stattfinden. Die Anwendung eines solchen Modells würde jedoch die Pathologie des Menschen nicht korrekt wiedergeben. Einfach transgene Mausmodelle, wie z.B. das APP^{swe}-Modell mit der schwedischen Doppelmutation, spiegeln die Alzheimer-Demenz des Menschen am besten wider und scheinen demzufolge auch für das *in vivo*-Therapiemonitoring von Interventionsstudien am besten geeignet zu sein.

4.2. Therapieerfolg anhand von PET-Ergebnissen

4.2.1 Diskussion der generierten PET-Daten

Bei separater Betrachtung der Einzelunterschiede im Vergleich von TG-GSM und TG-VEH ergab sich eine signifikante Zunahme im Verlauf von TG-VEH von einem Scanzeitpunkt zum jeweils darauf folgenden als auch ein signifikanter Unterschied bei der Gegenüberstellung der GSM- und der Vehikel-Gruppe. Da die Gruppe der behandelten Tiere mit einem gering höheren SUVR_{CTX/CBL}-Ausgangswert gestartet war, ergab sich beim Gruppenvergleich der Absolutwerte erst beim zweiten Follow-up-Scan ein statistisch signifikanter Unterschied (+9,1 %; $p < 0,05$). Betrachtet man jedoch die Zunahme der Traceraufnahme von einem Scanzeitpunkt zum nächsten im

Vergleich der beiden Gruppen, also die $\Delta\%$ -SUVR_{CTX/CBL}-Werte, so erhält man bereits von Baseline- auf den ersten Follow-up-Scan eine größere Zunahme des kortikalen Tracer-Signales bei TG-VEH als bei TG-GSM ($p < 0,05$). Sowohl von ersten Follow-up-Scan auf den zweiten Follow-up-Scan ($p < 0,05$) als auch von Baseline- auf zweiten Follow-up-Scan ($p < 0,001$) erhält man beim Gruppenvergleich ein statistisch hoch signifikantes Ergebnis. Aus der Diskrepanz zwischen der statistischen Signifikanz von Absolutwert zwischen TG-GSM und TG-VEH beim terminalen Scan ($p < 0,05$) und dem $\Delta\%$ -SUVR_{CTX/CBL}-Wert von Baseline- auf finalen Scan im Vergleich der beiden Gruppen ($p < 0,001$) lässt sich ableiten, dass die Traceraufnahme in Bezug auf die Baseline den Therapieerfolg besser widerspiegelt als die einzelne Betrachtung der Traceraufnahme je Scan-Zeitpunkt (s. Abbildung 10 und 11). Ein longitudinales Monitoring lässt sich nur mit dem PET als Detektionsmethode für Amyloid bewerkstelligen und bietet diesbezüglich gegenüber der Histologie und der Biochemie, welche die Amyloidlast bzw. A β -Peptidanzahl nur zu einem Zeitpunkt als Endresultat der Therapie und nicht in einem zeitlichen Verlauf wiedergeben können, einen Vorteil. Anhand der statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem erprobten GSM und der Vehikel-Substanz im PET, lässt sich postulieren, dass die Substanz RO5506284 in weiteren Studien erforscht werden sollte, jedoch mit höheren Versuchstierzahlen, um eine bessere Randomisierung in die verschiedenen Gruppen zu gewährleisten. Die Individuen könnten den Gruppen entsprechend ihrer Baseline-PET-Scans zugeteilt werden, um Gruppen mit möglichst vergleichbaren SUV_R_{CTX/CBL}-Ausgangswerten zu erhalten. Wie aus oben stehender Abbildung 14 erkenntlich ist, hängt der Therapieerfolg vom Krankheitsausmaß zu Beginn einer möglichen Therapie ab, wobei das PET über die Baseline-SUV_R_{CTX/CBL} eine Voraussage bezüglich Ansprechen auf die Therapie und eines weiteren Anstiegs des PET-Signales geben kann. Als Fazit lässt sich sagen, dass Tiere mit anfänglich

wenig Amyloid gut auf die Behandlung ansprechen, Mäuse mit bereits zu Beginn vielen Amyloidplaques jedoch weniger davon profitieren.

4.2.2 Diskussion der Maus-PET-Daten im Kontext von klinischen Studien

Im Gegensatz zu den hier generierten Daten ergab sich in ersten klinischen Studien ein ungünstiges Wirkungs-Nebenwirkungsprofil verschiedener GSM und GSI. Bei 14-wöchiger Verabreichung des unselektiven GSI Semigacestat bei Patienten mit milder bis mäßiger AD ergab sich keine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten im Vergleich zu einem Placebo. Zudem traten in der GSI-Gruppe mehr Nebenwirkungen, wie z.B. gastrointestinale Beschwerden und Hautausschlag, auf (Fleisher, Raman et al. 2008). Auch bei dem GSI Avagacestat, welcher eine höhere Selektivität für die A β -Synthese als für den Notch-Signalweg haben sollte, wurden dosisabhängig bei 24-wöchiger Verabreichung bei Patienten mit milder bis moderater AD oben genannte Nebenwirkungen beobachtet. Bei einer Dosis von 100 bzw. 125 mg/Tag trat sogar eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten ein (Coric, van Dyck et al. 2012). Auf Grund dieser eher enttäuschenden Erkenntnisse veränderte sich die pharmakologische Strategie in Richtung einer Gamma-Sekretase-Modulation. In einer Placebo-kontrollierten klinischen Studie konnte bei dem GSM Tarenflurbil, bei welchem es sich um ein NSAID-Derivat handelt, jedoch auch keine Besserung der kognitiven Fähigkeiten nachgewiesen werden. Tarenflurbil wurde Patienten mit milder AD über 18 Monate zweimal täglich verabreicht und verursachte als Nebenwirkungen Anämie, Schwindel und eine höhere Infektionsneigung (Green, Schneider et al. 2009). Ein weiterer GSM, E2210, ein non-NSAID-GSM, zeigte bei einmaliger Verabreichung bei gesunden

Probanden im Vergleich zum Placebo dosisunabhängige Nebenwirkungen wie Diarrhö und Kopfschmerz (jeweils Inzidenz von 8,8%), Anämie (Inzidenz von 7,0%), Schwindel und orthostatische Hypotonie (Inzidenz von 5,3%). Es konnte keine Aussage bzgl. Wirksamkeit gemacht werden (Yu, Logovinsky et al. 2013). Bei allen genannten klinischen Studien war die Amyloid-PET-Diagnostik kein Einschlusskriterium für die jeweilige Therapie, weshalb sehr wahrscheinlich auch demente Patienten ohne eine Amyloid-Pathologie in die Studien aufgenommen wurden. Die Auswahl der Studienteilnehmer erfolgte anhand klinischer Tests, wie z.B. der Alzheimer`s Disease Assessment Scale (ADAS). Der Therapieerfolg wurde ebenso durch klinische Tests sowie durch die Bestimmung der A β -Fraktionen im Liquor und im Plasma kontrolliert. Außerdem ist zu beachten, dass die Probanden bereits Symptome der Alzheimer-Krankheit vor Therapiebeginn aufwiesen und aller Wahrscheinlichkeit nach auch histopathologische Korrelate der Erkrankung, also Amyloidplaques im Gehirn. Gemäß der Annahme, dass der GSM RO5506284, wie wahrscheinlich auch die anderen Medikamente derselben Wirkstoffgruppe, nur präventiv auf die Amyloidoneogenese und nicht therapeutisch bei bereits vorhandenen Plaques wirken dürfte, könnte dies ein Erklärungsansatz für den schlechten Therapieerfolg der klinischen Studien sein. Demzufolge müsste man in künftigen Interventionsstudien mit einem GSM gesunde Probanden, welche ein hohes Risikoprofil für die Alzheimer-Demenz aufweisen, rekrutieren. Zudem sollte eine positive Amyloid-PET-Diagnostik ein Einschlusskriterium darstellen, um ein ausschließlich GSM-Therapie-sensitives Patientenkollektiv zu erhalten. Auch Golde et al. schrieben, dass GSM ebenso wie GSI in der Behandlung symptomatischer Patienten fehlschlage und dass die Herausforderung darin

bestehe, einen GSM zu entwickeln, der zumindest als Prophylaxe symptomloser Patienten verwendet werden könne (Golde, Koo et al. 2013).

4.3 Therapieerfolg anhand von Histodaten

4.3.1 Auswirkung der GSM Therapie auf Plaqueload, -dichte und -größe

Auch andere Forschungsgruppen haben die Auswirkung einer GSM-Therapie auf die Veränderung der Amyloidplaques im Gehirn untersucht. Am häufigsten wurde das Tg2576-Mausmodell verwendet. Dieses Modell entwickelt A β -Plaques im Alter von neun bis zehn Monaten (Hsiao, Chapman et al. 1996) und verhält sich damit dem hier verwendeten APP^{swe}-Modell sehr ähnlich, welches im Alter von neun Monaten eine beginnende A β -Akkumulation, mit zwölf Monaten eine Entwicklung von β -Amyloidplaques und mit 18 Monaten zahlreiche Plaques aufweist (Rominger, Brendel et al. 2013). Rogers et al. erreichte bei ca. sechs Monate alten Tieren nach 50-wöchiger Therapie mit 60 mg/kg/Tag des GSM EVP001596 eine 70 % geringere Plaqueload im Kortex als bei den mit Vehikel therapierten Kontrolltieren (Rogers, Felsenstein et al. 2012). Bei Van Broeck et al. konnte bei zu Beginn sechs Monate alten Mäusen nach siebenmonatiger Therapie mit 60 mg/kg/Tag des GSM JNJ40418677 eine 76 % geringere Plaqueload im Kortex im Vergleich zur Vehikel-Substanz nachgewiesen werden (Van Broeck, Chen et al. 2011) und bei Imbimbo et al. wurde bei 9,5 bis 10,5 Monate alten Tieren nach 17 Wochen dauernder Verabreichung von 60 mg/kg/Tag des GSM CHF5974 eine 52,2 % geringere Plaque area fraction im Kortex als bei der Vehikel-Gruppe beobachtet (Imbimbo, Del Giudice et al. 2007). Sivilia et al. verwendeten als GSM ebenso CHF5974 in derselben Dosierung und Tg2576-Mäuse, jedoch im Alter von sechs Monaten, und erzielten eine 61 % geringere Plaque area fraction nach 13-monatiger Therapie im Kortex als in der Kontrollgruppe (Sivilia, Lorenzini et al. 2013). Beim Vergleich der vier

vorangegangenen Studien fällt auf, dass Imbimbo et al mit 52,2 % den kleinsten Unterschied in der Plaqueload zwischen Therapie- und Kontrollgruppe aufwiesen. Da Sivilia et al. und Imbimbo et al. sogar denselben GSM verwendeten, könnte als möglicher Erklärungsversuch das mit 9,5 bis 10,5 Monaten höhere Alter der Tiere bei Imbimbo et al. herangezogen werden. Da die durchschnittlich vier Monate älteren Tiere bereits mehr Amyloidplaques aufweisen müssten, wäre es denkbar, dass die Substanz CHF5074 insbesondere die Neuentstehung von Plaques mindert, jedoch die bereits vorhandene Plaqueload weniger beeinträchtigt. Ebenso könnte allerdings auch der mit 17 Wochen bei Imbimbo et al. und mit 13 Monaten bei Sivilia et al. angegebene Behandlungszeitraum eine zusätzliche Erklärung sein. Da sich die Mausmodelle der Tg2576- und der APPswe-Mäuse in Bezug auf den Zeitraum der Plaqueentwicklung sehr ähnlich verhalten, könnte diese Überlegung auch auf die aktuelle Studie übertragen werden. Es hatten zwar alle Mäuse dasselbe Alter, jedoch nahmen die Tiere, welche zu Studienbeginn ein hohes PET-Signal und demzufolge eine höhere Plaqueentwicklung hatten, im Studienverlauf prozentual betrachtet bis zum finalen Scan stärker zu als Tiere mit einer anfänglich niedrigeren Traceranreicherung und einer geringeren Plaquelast (s. Abbildung 14). Rogers et al., Van Broeck et al. und Imbimbo et al. konnten sowohl eine signifikante Reduktion der Plaquedichte als auch der Plaqueload feststellen, jedoch nicht der Plaquegröße (Imbimbo, Del Giudice et al. 2007, Van Broeck, Chen et al. 2011, Rogers, Felsenstein et al. 2012). In der hier präsentierten Studie war die Plaqueload im Vergleich von GSM- und Vehikel-Gruppe in etwa gleich. Es bestand ein größerer Unterschied bei der Plaquegröße (= Dichte/Load; $p = 0,27$) und der Plaquedichte ($p = 0,42$), was den Gruppenvergleich betrifft. Nach Inkludierung der Kovariablen konnte jedoch sowohl für Plaqueload, als auch Plaquedichte ein statistisch signifikanter Unterschied berechnet werden, was mit den oben genannten Studien übereinstimmt.

Aus den Werten für Load und Dichte lässt sich ableiten, dass TG-GSM zum Studienende wenige, große Plaques und TG-VEH viele, kleine Plaques aufgewiesen haben dürfte (bei TG-GSM wird die in etwa selbe Fläche durch eine kleinere Anzahl eingenommen, also größere Plaques). Auf Grund der zu Studienbeginn höheren Baseline der TG-GSM kann man vermuten, dass Plaques bereits vermehrt in TG-GSM vorhanden waren und diese unter der Therapie ein Wachstum erfahren haben. Dies bekräftigt die Theorie, dass der GSM RO5506284 die Amyloidoneogenese einschränkt, hingegen kaum Wirkung auf das Wachstum bereits vorhandener Plaques hat. Dieselbe Vermutung äußerten Imbimbo et al. in Bezug auf deren verwendeten GSM CHF5074 (Imbimbo, Del Giudice et al. 2007). Das PET-Signal erfuhr in der TG-GSM-Gruppe keine wesentliche Zunahme, da die Traceranreicherung mehr mit der Zunahme der Anzahl, also der Dichte, assoziiert ist als mit der Load oder Plaquegröße (s. Abbildung 23). Das geringere PET-Signal bei wenigen, großen Plaques lässt sich sowohl durch eine geringere Anzahl an Bindungsstellen als auch durch Partialvolumeneffekte erklären. Bei wenigen, großen Plaques besteht ein größerer Abstand zwischen den einzelnen Plaques, wodurch das Signal der großen Plaques durch den angrenzenden plaquefreien Hintergrund ohne Traceraufnahme abgeschwächt wird und durch ein Verwischen in der Umgebung falsch niedrige Werte entstehen. In der TG-VEH-Gruppe nahm das PET-Signal zu und es dürfte eine Amyloidoneogenese stattgefunden haben.

4.3.2 Gegenüberstellung der verschiedenen histologischen Färbungen

Da verschiedene histopathologische Labore unterschiedliche Färbungen und Analysemethoden für die Amyloidbestimmung verwenden und durch unterschiedliche Färbungen auch verschiedene Bestandteile der Plaques angefärbt werden, lassen sich die Ergebnisse der verschiedenen Studien nicht immer eindeutig miteinander

vergleichen. Die unter 4.3.1 erwähnten Studien verwendeten alle außer Van Broeck et al., welcher 4G8 benutzte und welches sich vom 6E10 durch die Bindung an andere Aminosäuren des APP unterscheidet, 6E10, womit der kompakte Innenanteil der Plaques inklusive des umliegenden Halo-Saums mit diffusem A β dargestellt wird. 4G8 stellt die mittlere Domäne der A β -Peptide dar (Van Broeck, Chen et al. 2011). Rogers et al. verwendete zusätzlich Thioflavin-S, welches nur den Innenteil der Plaques sichtbar macht. In dieser Darstellungsmethode konnte eine Tendenz zur Größenabnahme der Thioflavin-S-positiven Plaques beobachtet werden, welche bei den 6E10-positiven Plaques gänzlich nicht vorhanden war (Rogers, Felsenstein et al. 2012). Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Kernbestandteile der Amyloidplaques im Gegensatz zu dem umliegenden diffusen Plaquesaum überwiegend aus A β 42 bestehen (Iwatsubo, Odaka et al. 1994), welches durch den verwendeten GSM in erster Linie verringert wird (Rogers, Felsenstein et al. 2012). Beim Vergleich dieser zwei Färbungen könnte man meinen, dass zwar der feste Innenanteil an Größe einbüßt, das umliegende diffuse A β jedoch gleich bleibt oder ausgleichend sogar wächst. Die in unserer Studie verwendete Methoxy-X04-Färbung ist gegen fibrilläres A β gerichtet, was dem kompakten Innenanteil entsprechen und somit ein ähnliches Färbeverhalten wie Thioflavin-S zeigen dürfte. Sowohl bei der Thioflavin-S-Färbung von Rogers et al. als auch bei der hier verwendeten Methoxy-X04-Färbung wurde eine Abnahme der Plaquegröße gezeigt.

4.4 Diskussion der biochemischen A β -Peptidverteilung

4.4.1 Auswirkung der GSM-Therapie auf A β 42 als amyloidogenen Faktor

Wie bereits in mehreren Studien beschrieben, scheint das längere Peptid A β 42 ein höheres amyloidogenes Potential als die kürzeren Formen zu besitzen. Gemäß

McGowan et al. wird die Plaquebildung durch A β 42 initiiert (McGowan, Pickford et al. 2005) und Younkin schrieb bereits 1998, dass die extrazelluläre Ablagerung von hoch amyloidogenem A β 42 verantwortlich für die Entstehung der Alzheimer-Demenz sei, und forderte die Entwicklung von Antidementiva, welche die A β 42-Level erniedrigen (Younkin 1998). In der Tat wies in der aktuellen Studie die TG-GSM-Gruppe im Vergleich zur TG-VEH-Gruppe einen um 40 % geringeren Wert der A β 42-Levels der Amyloidplaques auf, was auf die GSM-Therapie zurückzuführen sein sollte. Ebenso war das Verhältnis von unlöslichem A β 42 zu A β 40, welches den Großteil der A β -Peptide darstellte, in der TG-GSM-Gruppe um 39 % niedriger als in der TG-VEH-Gruppe. Auch der prozentuale Anteil des unlöslichen A β 42 an allen A β -Isoformen war in der TG-GSM-Gruppe um 23 % niedriger. Bei den löslichen A β -Peptiden zeigte die TG-GSM-Gruppe zwar einen um 26 % höheren A β 42-Absolutwert als die TG-VEH-Gruppe, jedoch war die Ratio von A β 42 zu A β 40 um 46 % niedriger, ebenso wie der prozentuale Anteil des A β 42 am gesamten A β um 44 % niedriger war. Vorbeschriebene präklinische GSM-Studien zeigten ebenfalls eine signifikante Erniedrigung des A β 42: bei einer 50-wöchigen Behandlung von Tg2576-Mäusen mit dem GSM EVP0015962 zeigte sich eine Reduktion von A β 42 um 53 % bei einer Dosis von 20 mg/kg täglich und eine Reduktion von A β 42 um 86 % bei einer Dosis von 60 mg/kg täglich, wobei jedoch auch A β -Gesamt um 49 % bzw. 64 % gesenkt wurde (Rogers, Felsenstein et al. 2012). Eine ähnliche Studie von Van Broeck et al. demonstrierte bei einer sieben Monate dauernden Therapie von sechs Monate alten Tg2576-Mäusen mit dem GSM JNJ40418677 eine Reduktion von A β 42 um 16 % bei einer Dosis von 20 mg/kg täglich und eine Reduktion von A β 42 um 76 % bei einer Dosis von 60 mg/kg täglich. Es wurde außerdem eine Erniedrigung von A β 38 und A β -Gesamt beobachtet (Van Broeck, Chen et al. 2011). In ähnlicher Weise zeigte sich bei Kounnas et al. 2010 bei einer sieben Monate dauernden täglichen

Therapie von acht Monate alten Tg2576-Mäusen mit Diarylaminothiazolen als GSM eine Reduktion von A β 42 um 52 %, von A β 40 um 41 % und von A β 38 um 47 % bei einer Dosis von jeweils 50 mg/kg (Kounnas, Danks et al. 2010). Ein weiterer GSM, nämlich SPI1865, senkte A β 42 und A β 38 im Gehirn von Tg2576-Mäusen nach sechs Tage dauernder Behandlung, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Loureiro, Dumin et al. 2013). Als Erklärungsversuch wurde eine hohe Proteinbindung des verwendeten GSM im Gehirn angegeben. Im Plasma wurden A β 42 und A β 38 statistisch signifikant gesenkt. Man versuchte sich die Diskrepanz zwischen Plasma und Gehirn durch die Bildung von peripherem A β in Tg2576-Mäusen zu erklären, welches einfacher von dem GSM SPI1865 beeinflusst werden kann (Kawarabayashi, Younkin et al. 2001, Loureiro, Dumin et al. 2013).

4.4.2 Korrelation der Biochemie mit PET und Histopathologie

Übereinstimmend mit der Annahme, dass A β 42 wesentlich für die Neuentstehung von Amyloidplaques verantwortlich sein soll, wies der biochemisch untersuchte Kortex der TG-GSM-Tiere beim finalen Scan ein um 9,1 % geringeres PET-Signal als der Kortex der TG-VEH-Gruppe auf. Die TG-GSM-Tiere mit den höchsten A β 42-Werten, welche demzufolge weniger auf die GSM-Therapie angesprochen hatten, zeigten auch im PET von Baseline-Scan auf terminalen Scan die höchste Zunahme an Traceranreicherung unter den behandelten Tieren, was untermauert, dass das PET-Signal gut mit den A β 42-Levels korrelierte (vgl. 3.5.2). Da A β 42 hoch amyloidogen ist, ist es nahe liegend, dass sowohl dieses als auch die Plaqueload und die Plaquedichte in der TG-VEH-Gruppe höhere Werte als in der TG-GSM-Gruppe aufwiesen. Die Korrelation fiel in der TG-VEH-Gruppe jedoch geringer aus als in TG-GSM.

4.5 Ausblick

Die hier dargestellte erste multimodale Langzeit-GSM-Therapiestudie zeigt durch das non-invasive PET-Verfahren und der einhergehenden Möglichkeit des longitudinalen Therapiemonitorings ein interessantes Studienkonzept für präklinische Medikamentenstudien auf. Durch die funktionelle Bildgebung zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten konnte die interindividuelle Variabilität in Bezug auf die Plaqueload zu Studienbeginn sowie die Amyloidkinetik im Studienverlauf gut widergespiegelt werden. Das Konzept der Baseline-Scans erlaubt eine prädiktive Aussage über den potentiellen Therapieerfolg. Eine exaktere Untersuchung der Auswirkung der GSM-Therapie auf die kognitiven Fähigkeiten sollten sowohl im Tiermodell als auch darauffolgend an AD erkrankten Probanden detaillierter untersucht werden. Die histopathologischen und biochemischen Hemisphären-Untersuchungen sind hierbei nicht als konkurrierende Verfahren, sondern als sinnvolle Ergänzung zu betrachten. Übertragen auf den Menschen würden die Ergebnisse bedeuten, dass ein möglichst frühzeitiger Therapiebeginn den größten individuellen Nutzen bringen dürfte und GSMs eher in der Prävention und nicht in der Interventionstherapie bereits klinischer kognitiver Einschränkungen wirksam scheinen. Die Verwendung des Amyloid-PETs als diagnostisches Tool zum Nachweis einer Amyloid-Pathologie in Patientenpopulationen könnte eine bessere Selektion und Zuordnung zur spezifischen anti-Amyloid-Therapiegruppe erlauben. Es würde primär eine Therapieoptimierung bedeuten und könnte sekundär hinsichtlich der Kosten ebenfalls positive Auswirkungen haben, was sicherlich in weiteren Studien näher zu untersuchen ist. Durch die Vereinigung von Diagnostik und Therapie dürfte das PET in der Alzheimerforschung künftig eine vielversprechende Schlüsselrolle darstellen.

5. Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Promotionsarbeit bestand im *in vivo*-Monitoring der Amyloidogenese in einem APP^{swE}-Mausmodell unter sechsmonatiger Therapie mit dem neuen Gamma-Sekretase-Modulator RO5506284 mittels longitudinaler Kleintier-Amyloid-PET-Diagnostik mit dem Tracer [¹⁸F]-Florbetaben und anschließender multimodaler histopathologischer und biochemischer *ex vivo*-Untersuchung. In bisherigen Studien erfolgte die Amyloidbestimmung entweder mittels histopathologischer oder biochemischer Verfahren, welche die Opferung der Versuchstiere voraussetzten. Die longitudinale PET-Diagnostik ermöglicht eine nicht invasive Bestimmung des individuellen β -Amyloidplaqueload-Verhaltens als Korrelat der Alzheimer-Demenz der einzelnen Versuchstiere. Im longitudinalen Verlauf wurden Gruppen von anfangs 12 Monate alten transgenen APP^{swE}-Mäusen und altersentsprechende C57Bl/6-Kontrollen mittels [¹⁸F]-Florbetaben-PET in einem Siemens Inveon Kleintier-PET-Scanner vor Therapiebeginn, nach viermonatiger und nach sechsmonatiger Behandlungsdauer gemessen. Als Folge der Randomisierung der transgenen Versuchstiere, wobei drei Tiere mit hohem Baseline-PET (> 2 SD) der TG-GSM-Gruppe zugeteilt wurden, war das Baseline-PET der TG-GSM um 4,2 % ($p = 0,11$) höher als der TG-VEH. Gegenüber dem Baseline-Scan stieg der kortikale Tracer-Uptake der transgenen therapierten Tiere bis zum zweiten Follow-up-Scan um 2,6 % ($p = 0,43$ im Vergleich zur Baseline) an, die mit Vehikel therapierten transgenen Tiere hingegen zeigten eine Zunahme von 17,1 % ($p < 0,001$ im Vergleich zur Baseline; $p < 0,001$ im Vergleich zu TG-GSM). Beim finalen Endpunktskan war die kortikale Signalanreicherung der TG-VEH 9,1 % höher als der TG-GSM ($p < 0,05$). Die C57Bl/6-Kontrolltiere zeigten weder in der GSM- noch der Vehikel-Gruppe eine signifikante Mehranreicherung des [¹⁸F]-Florbetaben. Die Höhe der kortikalen Traceraufnahme im Baseline-Scan der TG-GSM ($R = 0,67$ zwischen

BL und $\Delta\%_{\text{BL-FU2}}\text{SUVR}_{\text{CTX/CBL}}$ von BL auf FU2; $R = 0,90$ zwischen BL und FU2) konnte als Prädiktor für die weitere Zunahme der β -Amyloidlast identifiziert werden. In TG-VEH gab es keine Korrelation zwischen BL und $\Delta\%_{\text{BL-FU2}}\text{SUVR}_{\text{CTX/CBL}}$ ($R = -0,04$). Versuchstiere mit einer anfangs geringen kortikalen Signalanreicherung wiesen eine ausgezeichnete Ansprechrate auf die GSM-Therapie auf (z.B. zeigte Maus 06 mit der niedrigsten initialen $\text{SUVR}_{\text{CTX/CBL}}$ von 0,96 eine 5%ige Abnahme bis zum FU2), wohingegen die Tiere mit einer bereits vor Therapiebeginn hohen kortikalen Signalanreicherung wenig von der Therapie profitierten. Maus 05, welche den höchsten Baseline-Wert ($\text{SUVR}_{\text{CTX/CBL}}$ von 1,11) erzielte, hatte mit 8,4 % den zweiten höchsten Anstieg. Die histologische Methoxy-X04-Färbung für fibrilläres Amyloid zeigte eine hohe Übereinstimmung mit den PET-Daten der korrespondierenden Hemisphäre ($R = 0,79$; $p < 0,001$ für Plaqueload und FU2; $R = 0,84$; $p < 0,001$ für Plaquedichte und FU2). Sowohl die Plaqueload (-42,0 %; $p < 0,05$) als auch die Plaquedichte (-48,3 %; $p < 0,05$) waren in der TG-GSM-Gruppe signifikant niedriger als in der TG-VEH-Gruppe. Die Größe der Plaques war in der behandelten Gruppe um 20,0 % geringer ($p = 0,20$). Durch ein Histogramm konnte gezeigt werden, dass TG-GSM weniger kleine, jedoch mehr größere Plaques als TG-VEH aufwies, wobei der GSM RO5506284 insbesondere an der Hemmung der Amyloidoneogenese beteiligt war und einen geringeren Einfluss auf das Wachstum bereits bestehender Plaques hatte. Die biochemische Quantifizierung des unlöslichen β -Amyloid zeigte in TG-GSM eine 40 % ($p < 0,05$) geringere $A\beta_{42}$ -Last als in TG-VEH. Um der interindividuellen Variabilität gerecht zu werden, wurden die Ergebnisse mittels MANCOVA auf ihre individuelle Baseline normiert. Nach Inkludierung der Baseline als Kovariable war $A\beta_{42}$, welches unter den verschiedenen langen β -Amyloiden das höchste amyloidogene Potential besitzt, in TG-GSM 56 % ($p < 0,001$) geringer als in TG-VEH. Es zeigte sich eine gute Korrelation von $A\beta_{42}$ mit

den PET-Daten der entsprechenden Hemisphäre ($R = 0,83$; $p < 0,001$). Die Unterschiede der kürzeren, weniger amyloidenen β -Amyloide fielen zwischen TG-GSM und TG-VEH statistisch nicht signifikant aus. Auch bestand eine hohe Korrelation der A β 42-Last mit der Plaqueload ($R = 0,77$; $p < 0,001$) und der Plaquedichte ($R = 0,81$; $p < 0,001$), wobei jedoch die kontralateralen Hemisphären verglichen werden mussten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl in den PET-Daten als auch in der Histopathologie und Biochemie nach sechsmonatiger Therapie statistisch signifikante Gruppenunterschiede zwischen TG-GSM und TG-VEH erhoben werden konnten. Ungeklärt ist, ob der GSM RO5506284 tatsächlich zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungen und der Alltagsfunktion von Alzheimer-Patienten führen kann. Das Wirkspektrum dieses Antidementivums liegt mehr in der Prophylaxe als in der Therapie. Eine weitere Erforschung des GSM RO5506284 im Rahmen von Verhaltensstudien an Tieren und ggf. auch in klinischen Studien ist erstrebenswert. Das PET stellte eine ausgezeichnete Möglichkeit der Diagnostik und des *in vivo*-Therapiemonitorings dar, wobei die Variabilität zwischen den verschiedenen Versuchstieren widerspiegelt werden konnte. Dadurch und durch die nicht invasive-Verfahrensweise stellte es eine hervorragende Ergänzung zu den klassischen Endpunktanalysen der Histopathologie und Biochemie dar.

6. Summary

The objective of this doctoral thesis was the *in vivo* monitoring of amyloidogenesis in a model of APP^{swe} mice during six months of therapy with the new gamma-secretase modulator RO5506284. Therapy effects were determined by longitudinal small animal Amyloid-PET using the tracer [¹⁸F]-Florbetaben and subsequent multimodal histological and biochemical *ex vivo* examination. In former studies amyloid was determined by histopathological or biochemical methods after sacrificing

the laboratory animals. The longitudinal PET diagnostic enables a non-invasive determination of the individual β -Amyloid plaqueload of each single mouse as a correlate of Alzheimer's disease. Groups of transgenic APP^{swE} mice aged 12 months in the beginning and age-matched C57Bl/6 littermates were longitudinally imaged using a Siemens Inveon small animal PET and static 45 minute recordings were generated after injection of 11.1 ± 2.4 MBq [¹⁸F]-Florbetaben in the tail vein. Scans were performed before starting therapy, after four months and again after six months of therapy. After randomization of transgene laboratory animals to a therapy and a vehicle group, whereby three animals with elevated baseline PET (> 2 SD) were allocated to TG-GSM, baseline PET of TG-GSM was 4.2% ($p = 0.11$) higher than baseline PET of TG-VEH. In TG-GSM the cortical tracer uptake remained nearly constant (+2.6%; $p = 0.43$ from BL to FU2) whereas $\Delta\%$ -SUVR_{CTX/CBL} in TG-VEH increased by 17.1% ($p < 0.001$ from BL to FU2; $p < 0.001$ in comparison to TG-GSM). At study termination the cortical tracer uptake in TG-VEH was 9.1% higher than in TG-GSM ($p < 0.05$). The age-matched C57Bl/6 littermates did show any significant increase in cortical uptake of [¹⁸F]-Florbetaben in WT-GSM nor in WT-VEH. The intensity of cortical tracer uptake in the baseline scan of TG-GSM ($R = 0.67$ for BL and $\Delta\%$ _{BL-FU2}-SUVR_{CTX/CBL}; $R = 0.90$ for BL and FU2) was identified as a prediction of further increase of β -amyloid burden. In TG-VEH, there wasn't any correlation between BL and $\Delta\%$ _{BL-FU2}-SUVR_{CTX/CBL} ($R = -0.04$). Laboratory animals with little amyloid load in the beginning (e.g. mouse 06 with the lowest initial SUVR_{CTX/CBL} of 0.96 presented a decrease of 5% from BL to FU2) showed an excellent response rate to GSM therapy, whereas animals with high cortical tracer uptake before therapy start had little benefit of drug therapy. Mouse 05, with the highest baseline in the beginning (SUVR_{CTX/CBL} of 1.11), had the second highest increase of 8.4%. The histological methoxy-X04 staining for fibrillary amyloid

correlated well with the PET data of corresponding hemispheres ($R = 0.79$; $p < 0.001$ for plaqueload and FU2; $R = 0.84$; $p < 0.001$ for plaque density and FU2). Plaqueload (-42.0%; $p < 0.05$) as well as plaque density (-48.3%; $p < 0.05$) were in TG-GSM significantly lower than in TG-VEH. Plaque size was 20.0% lower in GSM treated animals ($p = 0.20$). Histogram plotting showed fewer small plaques in TG-GSM but more big plaques compared to TG-VEH animals. Reduced numbers of small plaques in TG-GSM indicates GSM RO5506284 inhibits de novo amyloidogenesis but has little effect on growth of already existing plaques. Unsoluble β 42-amyloid was in TG-GSM 40% ($p < 0.05$) lower than in TG-VEH. Respecting the interanimal variability the results were scaled on their individual baseline using MANCOVA. $A\beta$ 42 showing the highest amyloidogenic potential was in TG-GSM 56% lower ($p < 0.001$) than in TG-VEH. There was a good correlation between $A\beta$ 42 and PET results of corresponding hemispheres ($R = 0.83$; $p < 0.001$). The shorter and less amyloidogenic β -amyloids didn't differ significantly between TG-GSM and TG-VEH. Comparing the contralateral hemispheres nevertheless, $A\beta$ 42 and Plaqueload presented a high correlation of $R = 0.77$ ($p < 0.001$) as well as $A\beta$ 42 and plaque density ($R = 0.81$; $p < 0.001$). All in all, PET data as well as histological and biochemical results showed statistical significant differences between TG-GSM and TG-VEH after six months of therapy. Until now, the real influence of GSM RO5506284 on improvement of cognitive performance and everyday life is unknown. In any case, GSM RO5506284 should be used as a prophylactic drug and not as a therapeutic medication. Further studies, especially behavioral studies with laboratory animals and clinical trials, are necessary. PET was an excellent tool for diagnosis and *in vivo* monitoring. It is an outstanding supplement to classical end point analyses like histology and biochemistry clarifying the interanimal variability and enabling a non-invasive investigation.

7. Literaturverzeichnis

- Akama, K. T., C. Albanese, R. G. Pestell and L. J. Van Eldik (1998). "Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5795-5800.
- Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G. M. Cole, N. R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B. L. Fiebich, C. E. Finch, S. Frautschy, W. S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I. R. Mackenzie, P. L. McGeer, M. K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F. L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegryzniak, G. Wenk and T. Wyss-Coray (2000). "Inflammation and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **21**(3): 383-421.
- Barthel, H., J. Luthardt, G. Becker, M. Patt, E. Hammerstein, K. Hartwig, B. Eggers, B. Sattler, A. Schildan, S. Hesse, P. M. Meyer, H. Wolf, T. Zimmermann, J. Reischl, B. Rohde, H. J. Gertz, C. Reininger and O. Sabri (2011). "Individualized quantification of brain beta-amyloid burden: results of a proof of mechanism phase 0 florbetaben PET trial in patients with Alzheimer's disease and healthy controls." Eur J Nucl Med Mol Imaging **38**(9): 1702-1714.
- Braak, H. and E. Braak (1997). "Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories." Neurobiol Aging **18**(4): 351-357.
- Brendel, M., A. Delker, C. Rotzer, G. Boning, J. Carlsen, C. Cyran, E. Mille, F. J. Gildehaus, P. Cumming, K. Baumann, H. Steiner, C. Haass, J. Herms, P. Bartenstein and A. Rominger (2014). "Impact of partial volume effect correction on cerebral beta-amyloid imaging in APP-Swe mice using [(18)F]-florbetaben PET." Neuroimage **84**: 843-853.
- Bullock, R., J. Touchon, H. Bergman, G. Gambina, Y. He, G. Rapatz, J. Nagel and R. Lane (2005). "Rivastigmine and donepezil treatment in moderate to moderately-severe Alzheimer's disease over a 2-year period." Curr Med Res Opin **21**(8): 1317-1327.
- Burns, A., J. O'Brien, S. Auriacombe, C. Ballard, K. Broich, R. Bullock, H. Feldman, G. Ford, M. Knapp, A. McCaddon, S. Iliffe, C. Jacova, R. Jones, S. Lennon, I. McKeith, J. M. Orgogozo, N. Purandare, M. Richardson, C. Ritchie, A. Thomas, J. Warner, G. Wilcock and D. Wilkinson (2006). "Clinical practice with anti-dementia drugs: a consensus statement from British Association for Psychopharmacology." J Psychopharmacol **20**(6): 732-755.
- Cipriani, G., C. Dolciotti, L. Picchi and U. Bonuccelli (2011). "Alzheimer and his disease: a brief history." Neurol Sci **32**(2): 275-279.
- Coric, V., C. H. van Dyck, S. Salloway, N. Andreasen, M. Brody, R. W. Richter, H. Soininen, S. Thein, T. Shiovitz, G. Pilcher, S. Colby, L. Rollin, R. Dockens, C. Pachai, E. Portelius, U. Andreasson, K. Blennow, H. Soares, C. Albright, H. H. Feldman and R. M. Berman (2012). "Safety and tolerability of the gamma-secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease." Arch Neurol **69**(11): 1430-1440.
- Davies, C. A., D. M. Mann, P. Q. Sumpter and P. O. Yates (1987). "A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease." J Neurol Sci **78**(2): 151-164.
- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura and F. Van Leuven (1998). "Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein." Nature **391**(6665): 387-390.
- Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, H. Hampel, J. L. Molinuevo, K. Blennow, S. T. DeKosky, S. Gauthier, D. Selkoe, R. Bateman, S. Cappa, S. Crutch, S. Engelborghs, G. B. Frisoni, N. C. Fox, D. Galasko, M. O. Habert, G. A. Jicha, A. Nordberg, F. Pasquier, G. Rabinovici, P. Robert, C. Rowe, S. Salloway, M. Sarazin, S. Epelbaum, L. C. de Souza, B. Vellas, P. J. Visser, L. Schneider, Y. Stern, P. Scheltens and J. L. Cummings (2014). "Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria." Lancet Neurol **13**(6): 614-629.
- Duyckaerts, C., B. Delatour and M. C. Potier (2009). "Classification and basic pathology of Alzheimer disease." Acta Neuropathol **118**(1): 5-36.

Duyckaerts, C., M. C. Potier and B. Delatour (2008). "Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences." *Acta Neuropathol* **115**(1): 5-38.

Fleisher, A. S., R. Raman, E. R. Siemers, L. Becerra, C. M. Clark, R. A. Dean, M. R. Farlow, J. E. Galvin, E. R. Peskind, J. F. Quinn, A. Sherzai, B. B. Sowell, P. S. Aisen and L. J. Thal (2008). "Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease." *Arch Neurol* **65**(8): 1031-1038.

Ghosh, A. K., M. Brindisi and J. Tang (2012). "Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease." *J Neurochem* **120 Suppl 1**: 71-83.

Golde, T. E., E. H. Koo, K. M. Felsenstein, B. A. Osborne and L. Miele (2013). "gamma-Secretase inhibitors and modulators." *Biochim Biophys Acta* **1828**(12): 2898-2907.

Green, R. C., L. S. Schneider, D. A. Amato, A. P. Beelen, G. Wilcock, E. A. Swabb and K. H. Zavitz (2009). "Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial." *Jama* **302**(23): 2557-2564.

Hardy, J., K. Duff, K. G. Hardy, J. Perez-Tur and M. Hutton (1998). "Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau." *Nat Neurosci* **1**(5): 355-358.

Herreman, A., L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans and B. De Strooper (2000). "Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells." *Nat Cell Biol* **2**(7): 461-462.

Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang and G. Cole (1996). "Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." *Science* **274**(5284): 99-102.

Imbimbo, B. P., E. Del Giudice, D. Colavito, A. D'Arrigo, M. Dalle Carbonare, G. Villetti, F. Facchinetti, R. Volta, V. Pietrini, M. F. Baroc, L. Serneels, B. De Strooper and A. Leon (2007). "1-(3',4'-Dichloro-2-fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclopropanecarboxylic acid (CHF5074), a novel gamma-secretase modulator, reduces brain beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease without causing peripheral toxicity." *J Pharmacol Exp Ther* **323**(3): 822-830.

Imbimbo, B. P., B. Hutter-Paier, G. Villetti, F. Facchinetti, V. Cenacchi, R. Volta, A. Lanzillotta, M. Pizzi and M. Windisch (2009). "CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease." *Br J Pharmacol* **156**(6): 982-993.

Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina and Y. Ihara (1994). "Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43)." *Neuron* **13**(1): 45-53.

Kadir, A., O. Almkvist, A. Wall, B. Langstrom and A. Nordberg (2006). "PET imaging of cortical 11C-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease." *Psychopharmacology (Berl)* **188**(4): 509-520.

Karran, E., M. Mercken and B. De Strooper (2011). "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* **10**(9): 698-712.

Kawarabayashi, T., L. H. Younkin, T. C. Saido, M. Shoji, K. H. Ashe and S. G. Younkin (2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **21**(2): 372-381.

Klunk, W. E., B. J. Bacskai, C. A. Mathis, S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, M. P. Frosch, M. L. Debnath, D. P. Holt, Y. Wang and B. T. Hyman (2002). "Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative." *J Neuropathol Exp Neurol* **61**(9): 797-805.

Klunk, W. E., H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G. F. Huang, S. Estrada, B. Ausen, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis and B. Langstrom (2004). "Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B." *Ann Neurol* **55**(3): 306-319.

Klunk, W. E., B. J. Lopresti, M. D. Ikonomic, I. M. Lefterov, R. P. Koldamova, E. E. Abrahamson, M. L. Debnath, D. P. Holt, G. F. Huang, L. Shao, S. T. DeKosky, J. C. Price and C. A. Mathis (2005). "Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-

beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain." *J Neurosci* **25**(46): 10598-10606.

Kounnas, M. Z., A. M. Danks, S. Cheng, C. Tyree, E. Ackerman, X. Zhang, K. Ahn, P. Nguyen, D. Comer, L. Mao, C. Yu, D. Pleyne, P. J. Digregorio, G. Velicelebi, K. A. Stauderman, W. T. Comer, W. C. Mobley, Y. M. Li, S. S. Sisodia, R. E. Tanzi and S. L. Wagner (2010). "Modulation of gamma-secretase reduces beta-amyloid deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Neuron* **67**(5): 769-780.

Kuntner, C., A. L. Kesner, M. Bauer, R. Kremslehner, T. Wanek, M. Mandler, R. Karch, J. Stanek, T. Wolf, M. Muller and O. Langer (2009). "Limitations of small animal PET imaging with [18F]FDDNP and FDG for quantitative studies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Mol Imaging Biol* **11**(4): 236-240.

LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* **8**(7): 499-509.

Lee, H. P., G. Casadesus, X. Zhu, H. G. Lee, G. Perry, M. A. Smith, K. Gustaw-Rothenberg and A. Lerner (2009). "All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease." *Expert Rev Neurother* **9**(11): 1615-1621.

Lemere, C. A. (2009). "Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine." *Prog Brain Res* **175**: 83-93.

Li, X., D. Song and S. X. Leng (2015). "Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment." *Clin Interv Aging* **10**: 549-560.

Loureiro, R. M., J. A. Dumin, T. D. McKee, W. F. Austin, N. O. Fuller, J. L. Hubbs, R. Shen, J. Jonker, J. Ives, B. S. Bronk and B. Tate (2013). "Efficacy of SPI-1865, a novel gamma-secretase modulator, in multiple rodent models." *Alzheimers Res Ther* **5**(2): 19.

Maeda, J., B. Ji, T. Irie, T. Tomiyama, M. Maruyama, T. Okauchi, M. Staufenbiel, N. Iwata, M. Ono, T. C. Saido, K. Suzuki, H. Mori, M. Higuchi and T. Suhara (2007). "Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography." *J Neurosci* **27**(41): 10957-10968.

Mannheim, J. G., M. S. Judenhofer, A. Schmid, J. Tillmanns, D. Stiller, V. Sossi and B. J. Pichler (2012). "Quantification accuracy and partial volume effect in dependence of the attenuation correction of a state-of-the-art small animal PET scanner." *Phys Med Biol* **57**(12): 3981-3993.

Manook, A., B. H. Yousefi, A. Willuweit, S. Platzer, S. Reder, A. Voss, M. Huisman, M. Settles, F. Neff, J. Velden, M. Schoor, H. von der Kammer, H. J. Wester, M. Schwaiger, G. Henriksen and A. Drzezga (2012). "Small-animal PET imaging of amyloid-beta plaques with [11C]PiB and its multi-modal validation in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease." *PLoS One* **7**(3): e31310.

McGowan, E., F. Pickford, J. Kim, L. Onstead, J. Eriksen, C. Yu, L. Skipper, M. P. Murphy, J. Beard, P. Das, K. Jansen, M. Delucia, W. L. Lin, G. Dolios, R. Wang, C. B. Eckman, D. W. Dickson, M. Hutton, J. Hardy and T. Golde (2005). "Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice." *Neuron* **47**(2): 191-199.

McKeith, I. G., D. W. Dickson, J. Lowe, M. Emre, J. T. O'Brien, H. Feldman, J. Cummings, J. E. Duda, C. Lippa, E. K. Perry, D. Aarsland, H. Arai, C. G. Ballard, B. Boeve, D. J. Burn, D. Costa, T. Del Ser, B. Dubois, D. Galasko, S. Gauthier, C. G. Goetz, E. Gomez-Tortosa, G. Halliday, L. A. Hansen, J. Hardy, T. Iwatsubo, R. N. Kalaria, D. Kaufer, R. A. Kenny, A. Korczyn, K. Kosaka, V. M. Lee, A. Lees, I. Litvan, E. Londos, O. L. Lopez, S. Minoshima, Y. Mizuno, J. A. Molina, E. B. Mukaetova-Ladinska, F. Pasquier, R. H. Perry, J. B. Schulz, J. Q. Trojanowski and M. Yamada (2005). "Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium." *Neurology* **65**(12): 1863-1872.

Mosconi, L. (2005). "Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**(4): 486-510.

Mosconi, L., R. Mistur, R. Switalski, W. H. Tsui, L. Glodzik, Y. Li, E. Pirraglia, S. De Santi, B. Reisberg, T. Wisniewski and M. J. de Leon (2009). "FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **36**(5): 811-822.

Nordberg, A., J. O. Rinne, A. Kadir and B. Langstrom (2010). "The use of PET in Alzheimer disease." *Nat Rev Neurol* **6**(2): 78-87.

Okamura, N., S. Furumoto, M. T. Fodero-Tavoletti, R. S. Mulligan, R. Harada, P. Yates, S. Pejoska, Y. Kudo, C. L. Masters, K. Yanai, C. C. Rowe and V. L. Villemagne (2014). "Non-invasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK5105 PET." *Brain* **137**(Pt 6): 1762-1771.

Poisnel, G., M. Dhilly, O. Moustie, J. Delamare, A. Abbas, D. Guilloteau and L. Barre (2012). "PET imaging with [18F]AV-45 in an APP/PS1-21 murine model of amyloid plaque deposition." *Neurobiol Aging* **33**(11): 2561-2571.

Prencipe, M., A. R. Casini, C. Ferretti, M. T. Lattanzio, M. Fiorelli and F. Culasso (1996). "Prevalence of dementia in an elderly rural population: effects of age, sex, and education." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **60**(6): 628-633.

Rascovsky, K., J. R. Hodges, D. Knopman, M. F. Mendez, J. H. Kramer, J. Neuhaus, J. C. van Swieten, H. Seelaar, E. G. Dopper, C. U. Onyike, A. E. Hillis, K. A. Josephs, B. F. Boeve, A. Kertesz, W. W. Seeley, K. P. Rankin, J. K. Johnson, M. L. Gorno-Tempini, H. Rosen, C. E. Prioleau-Latham, A. Lee, C. M. Kipps, P. Lillo, O. Piguet, J. D. Rohrer, M. N. Rossor, J. D. Warren, N. C. Fox, D. Galasko, D. P. Salmon, S. E. Black, M. Mesulam, S. Weintraub, B. C. Dickerson, J. Diehl-Schmid, F. Pasquier, V. Deramecourt, F. Lebert, Y. Pijnenburg, T. W. Chow, F. Manes, J. Grafman, S. F. Cappa, M. Freedman, M. Grossman and B. L. Miller (2011). "Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia." *Brain* **134**(Pt 9): 2456-2477.

Reisberg, B., R. Doody, A. Stoffler, F. Schmitt, S. Ferris and H. J. Mobius (2003). "Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease." *N Engl J Med* **348**(14): 1333-1341.

Richards, J. G., G. A. Higgins, A. M. Ouagazzal, L. Ozmen, J. N. Kew, B. Bohrmann, P. Malherbe, M. Brockhaus, H. Loetscher, C. Czech, G. Huber, H. Bluethmann, H. Jacobsen and J. A. Kemp (2003). "PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPswe, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation." *J Neurosci* **23**(26): 8989-9003.

Rinne, J. O., D. J. Brooks, M. N. Rossor, N. C. Fox, R. Bullock, W. E. Klunk, C. A. Mathis, K. Blennow, J. Barakos, A. A. Okello, S. Rodriguez Martinez de Liano, E. Liu, M. Koller, K. M. Gregg, D. Schenk, R. Black and M. Grundman (2010). "11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study." *Lancet Neurol* **9**(4): 363-372.

Rogers, K., K. M. Felsenstein, L. Hrdlicka, Z. Tu, F. Albayya, W. Lee, S. Hopp, M. J. Miller, D. Spaulding, Z. Yang, H. Hodgdon, S. Nolan, M. Wen, D. Costa, J. F. Blain, E. Freeman, B. De Strooper, V. Vulsteke, L. Scrocchi, H. Zetterberg, E. Portelius, B. Hutter-Paier, D. Havas, M. Ahljianian, D. Flood, L. Leventhal, G. Shapiro, H. Patzke, R. Chesworth and G. Koenig (2012). "Modulation of gamma-secretase by EVP-0015962 reduces amyloid deposition and behavioral deficits in Tg2576 mice." *Mol Neurodegener* **7**: 61.

Rojas, S., J. R. Herance, J. D. Gispert, S. Abad, E. Torrent, X. Jimenez, D. Pareto, U. Perpina, S. Sarroca, E. Rodriguez, A. Ortega-Aznar and C. Sanfeliu (2013). "In vivo evaluation of amyloid deposition and brain glucose metabolism of 5XFAD mice using positron emission tomography." *Neurobiol Aging* **34**(7): 1790-1798.

Roman, G. C., T. K. Tatemichi, T. Erkinjuntti, J. L. Cummings, J. C. Masdeu, J. H. Garcia, L. Amaducci, J. M. Orgogozo, A. Brun, A. Hofman and et al. (1993). "Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International Workshop." *Neurology* **43**(2): 250-260.

Rominger, A., M. Brendel, S. Burgold, K. Keppler, K. Baumann, G. Xiong, E. Mille, F. J. Gildehaus, J. Carlsen, J. Schlichtiger, S. Niedermoser, B. Wangler, P. Cumming, H. Steiner, J. Herms, C. Haass and P. Bartenstein (2013). "Longitudinal assessment of cerebral beta-amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant beta-amyloid precursor protein using 18F-florbetaben PET." *J Nucl Med* **54**(7): 1127-1134.

Schulz, V. (2003). "Ginkgo extract or cholinesterase inhibitors in patients with dementia: what clinical trials and guidelines fail to consider." *Phytomedicine* **10 Suppl 4**: 74-79.

Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." *Science* **298**(5594): 789-791.

Sivilia, S., L. Lorenzini, A. Giuliani, M. Gusciglio, M. Fernandez, V. A. Baldassarro, C. Mangano, L. Ferraro, V. Pietrini, M. F. Baroc, A. R. Viscomi, S. Ottonello, G. Villetti, B. P. Imbimbo, L. Calza and L.

Giardino (2013). "Multi-target action of the novel anti-Alzheimer compound CHF5074: in vivo study of long term treatment in Tg2576 mice." *BMC Neurosci* **14**: 44.

Snellman, A., F. R. Lopez-Picon, J. Rokka, M. Salmona, G. Forloni, M. Scheinin, O. Solin, J. O. Rinne and M. Haaparanta-Solin (2013). "Longitudinal Amyloid Imaging in Mouse Brain with ¹¹C-PIB: Comparison of APP23, Tg2576, and APP^{swe}-PS1dE9 Mouse Models of Alzheimer Disease." *J Nucl Med* **54**(8): 1434-1441.

Snellman, A., J. Rokka, F. R. Lopez-Picon, O. Eskola, M. Salmona, G. Forloni, M. Scheinin, O. Solin, J. O. Rinne and M. Haaparanta-Solin (2014). "In vivo PET imaging of beta-amyloid deposition in mouse models of Alzheimer's disease with a high specific activity PET imaging agent [¹⁸F]flutemetamol." *EJNMMI Res* **4**: 37.

Steenland, K., C. Karnes, R. Seals, C. Carnevale, A. Hermida and A. Levey (2012). "Late-life depression as a risk factor for mild cognitive impairment or Alzheimer's disease in 30 US Alzheimer's disease centers." *J Alzheimers Dis* **31**(2): 265-275.

Sun, G. Y., Y. He, D. Y. Chuang, J. C. Lee, Z. Gu, A. Simonyi and A. Y. Sun (2012). "Integrating cytosolic phospholipase A(2) with oxidative/nitrosative signaling pathways in neurons: a novel therapeutic strategy for AD." *Mol Neurobiol* **46**(1): 85-95.

Sun, X., L. Jin and P. Ling (2012). "Review of drugs for Alzheimer's disease." *Drug Discov Ther* **6**(6): 285-290.

Teipel, S. J., R. Buchert, J. Thome, H. Hampel and J. Pahnke (2011). "Development of Alzheimer-disease neuroimaging-biomarkers using mouse models with amyloid-precursor protein-transgene expression." *Prog Neurobiol* **95**(4): 547-556.

Tezapsidis, N., J. M. Johnston, M. A. Smith, J. W. Ashford, G. Casadesus, N. K. Robakis, B. Wolozin, G. Perry, X. Zhu, S. J. Greco and S. Sarkar (2009). "Leptin: a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **16**(4): 731-740.

Toyama, H., D. Ye, M. Ichise, J. S. Liow, L. Cai, D. Jacobowitz, J. L. Musachio, J. Hong, M. Crescenzo, D. Tipre, J. Q. Lu, S. Zoghbi, D. C. Vines, J. Seidel, K. Katada, M. V. Green, V. W. Pike, R. M. Cohen and R. B. Innis (2005). "PET imaging of brain with the beta-amyloid probe, [¹¹C]6-OH-BTA-1, in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**(5): 593-600.

Tricco, A. C., S. Vandervart, C. Soobiah, E. Lillie, L. Perrier, M. H. Chen, B. Hemmelgarn, S. R. Majumdar and S. E. Straus (2012). "Efficacy of cognitive enhancers for Alzheimer's disease: protocol for a systematic review and network meta-analysis." *Syst Rev* **1**: 31.

Truchot, L., N. Costes, L. Zimmer, B. Laurent, D. Le Bars, C. Thomas-Anterion, B. Mercier, M. Hermier, A. Vighetto and P. Krolak-Salmon (2008). "A distinct [¹⁸F]MPPF PET profile in amnesic mild cognitive impairment compared to mild Alzheimer's disease." *Neuroimage* **40**(3): 1251-1256.

Vallabhajosula, S. (2011). "Positron emission tomography radiopharmaceuticals for imaging brain Beta-amyloid." *Semin Nucl Med* **41**(4): 283-299.

Van Broeck, B., J. M. Chen, G. Treton, M. Desmidt, C. Hopf, N. Ramsden, E. Karran, M. Mercken and A. Rowley (2011). "Chronic treatment with a novel gamma-secretase modulator, JNJ-40418677, inhibits amyloid plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease." *Br J Pharmacol* **163**(2): 375-389.

Versijpt, J. J., F. Dumont, K. J. Van Laere, D. Decoo, P. Santens, K. Audenaert, E. Achten, G. Slegers, R. A. Dierckx and J. Korf (2003). "Assessment of neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer's disease with radiolabelled PK11195 and single photon emission computed tomography. A pilot study." *Eur Neurol* **50**(1): 39-47.

Villemagne, V. L., K. Ong, R. S. Mulligan, G. Holl, S. Pejoska, G. Jones, G. O'Keefe, U. Ackerman, H. Tochon-Danguy, J. G. Chan, C. B. Reininger, L. Fels, B. Putz, B. Rohde, C. L. Masters and C. C. Rowe (2011). "Amyloid imaging with (¹⁸F)-florbetaben in Alzheimer disease and other dementias." *J Nucl Med* **52**(8): 1210-1217.

Visser, E. P., J. A. Disselhorst, M. Brom, P. Laverman, M. Gotthardt, W. J. Oyen and O. C. Boerman (2009). "Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner." *J Nucl Med* **50**(1): 139-147.

Waegemans, T., C. R. Wilsher, A. Danniau, S. H. Ferris, A. Kurz and B. Winblad (2002). "Clinical efficacy of piracetam in cognitive impairment: a meta-analysis." Dement Geriatr Cogn Disord **13**(4): 217-224.

Weggen, S., J. L. Eriksen, P. Das, S. A. Sagi, R. Wang, C. U. Pietrzik, K. A. Findlay, T. E. Smith, M. P. Murphy, T. Bulter, D. E. Kang, N. Marquez-Sterling, T. E. Golde and E. H. Koo (2001). "A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity." Nature **414**(6860): 212-216.

Wiley, C. A., B. J. Lopresti, S. Venetis, J. Price, W. E. Klunk, S. T. DeKosky and C. A. Mathis (2009). "Carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B and carbon 11-labeled (R)-PK11195 positron emission tomographic imaging in Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(1): 60-67.

Wong, G. T., D. Manfra, F. M. Poulet, Q. Zhang, H. Josien, T. Bara, L. Engstrom, M. Pinzon-Ortiz, J. S. Fine, H. J. Lee, L. Zhang, G. A. Higgins and E. M. Parker (2004). "Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation." J Biol Chem **279**(13): 12876-12882.

Younkin, S. G. (1998). "The role of A beta 42 in Alzheimer's disease." J Physiol Paris **92**(3-4): 289-292.

Yu, Y., V. Logovinsky, E. Schuck, J. Kaplow, M. K. Chang, T. Miyagawa, N. Wong and J. Ferry (2013). "Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel gamma-secretase modulator, E2212, in healthy human subjects." J Clin Pharmacol.

Ziegler-Graham, K., R. Brookmeyer, E. Johnson and H. M. Arrighi (2008). "Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates." Alzheimers Dement **4**(5): 316-323.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Matthias Brendel von der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität München für dessen großartige Betreuung, Unterstützung sowohl bei der Durchführung als auch Auswertung der Versuche und dessen unbeschreibliche Geduld beim vielfachen Erklären.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Axel Rominger von der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität München, danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Bartenstein möchte ich für die Ermöglichung des Projektes danken.

Weiterhin danke ich Rosel Oos, Karin Bormann-Giglmaier für die exzellente methodische und technische Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Schwester Bettina bedanken, welche mir stets bei meiner schulischen und universitären Ausbildung zur Seite stand.

Mein Lebensgefährte Stefan hat mich immerzu ermutigt, den Mut nicht zu verlieren und meinen Weg fortzusetzen, auch wenn dieser manchmal steil und schwierig erschien.

Eidesstattliche Versicherung

Rötzer, Christina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Monitoring einer chronischen Behandlung mit einem Gamma-Sekretase-Modulator mittels Amyloid-PET im transgenen Alzheimer-Mausmodell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand