

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. Peter Bartenstein



*Analysen der Amyloid- und Tau-Pathologie an verschiedenen transgenen
Mausmodellen mittels Positronen-Emissions-Tomographie*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Federico Probst

aus

München

Jahr

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Axel Rominger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Mikael Simons
Prof. Dr. Michael Ewers

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Matthias Brendel
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2021



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Probst Federico

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Analysen der Amyloid- und Tau-Pathologie an verschiedenen transgenen Mausmodellen
mittels Positronen-Emissions-Tomographie**

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.

München den 28.11.2021

Ort, Datum

Federico Probst

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Die vorliegende kumulative Dissertation umfasst folgende bereits publizierte Manuskripte:

Brendel, M., **Probst, F.*****, Jaworska, A., Overhoff, F., Korzhova, V., Albert, N. L., Beck, R., Lindner, S., Gildehaus, F.J., Baumann, K., Bartenstein, P., Kleinberger, G., Haass, C., Herms, J., Rominger, A., 2016. Glial activation and glucose metabolism in a transgenic amyloid mouse model: a triple-tracer PET study. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(6), 954-960.

*** geteilte Erstautorenschaft

Brendel, M., Jaworska, A., **Probst, F.**, Overhoff, F., Korzhova, V., Lindner, S., Carlsen, J., Bartenstein, P., Harada, R., Kudo, Y., Haass, C., Van Leuven, F., Okamura, N., Herms, J., Rominger, A., 2016. Small-animal PET imaging of tau pathology with 18F-THK5117 in 2 transgenic mouse models. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(5), 792-798.

Inhalt

1. Einführung

1.1 Pathologische Prozesse der Alzheimer-Demenz - β -Amyloidopathie.....	9
1.2 Neuroinflammation in Zusammenschau der Alzheimer-Demenz.....	10
1.3 Tauopathie.....	11
1.4 PET-Diagnostik des M. Alzheimer.....	12
1.5 Mausmodelle der Alzheimer-Pathologie.....	13
1.6 Kleintier PET Studien zur Detektion von Amyloidablagerung, Neuroinflammation und Tauopathie.....	15

2. Inhalte und Eigenanteil der Promotionsarbeit

2.1 PET-Bildgebung von Gliazellaktivierung, Amyloidablagerung und Glucose Metabolismus am PS2/APP-transgenen Mausmodell.....	17
2.2 PET-Bildgebung der Tau-Pathologie mittels ^{18}F -THK5117 in zwei transgenen Mausmodellen	22
2.3 Beitrag zu den Veröffentlichungen.....	30

3. Zusammenfassung

4. Summary

5. **Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model:

A Triple-Tracer PET Study**
6. **Small-Animal PET Imaging of Tau Pathology with ¹⁸F-THK5117 in 2 Transgenic Mouse

Models**
7. **Literaturverzeichnis**
8. **Danksagung**
9. **Curriculum Vitae**

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer-Demenz
¹⁸ F-FDG	Fluordesoxyglucose
¹⁸ F-FBB	Florbetaben
¹⁸ F-GE180	TSPO-Tracer
¹¹ C-PIB	Pittsburgh Compound B
MCI	Mild cognitive impairment leichte kognitive Beeinträchtigung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
biGT	Bigenetische Glucose- und tau-Stoffwechsel Mutation (zur Anwendung in einem Mausmodell)
NFT	neurofibrillary tangles neurofibrilläre Bündel
TSPO	Translokatorprotein
SPM	Statistical parametric mapping (voxelbasierter Vergleich des Test- und Kontrollbildes)
BPnd	Bindungspotential
SUV	Standard Aufnahme Werte
VOI	Volume of Interest
ROI	Region of Interest
CBL	Cerebellum

PS2/APP	Presenilin-2/Amyloid Precursor Protein- genetische Mutationslinie des Mausmodells
Bst	Brainstem (Hirnstamm)
*	This research was originally published in JNM: Brendel, Matthias, et al. "Glial activation and glucose metabolism in a transgenic amyloid mouse model: a triple-tracer PET study." <i>Journal of Nuclear Medicine</i> 57.6 (2016): 954-960.
**	This research was originally published in JNM: Brendel, Matthias, et al. "Small-animal PET imaging of tau pathology with 18F-THK5117 in 2 transgenic mouse models." <i>Journal of Nuclear Medicine</i> 57.5 (2016): 792-798

1. Einführung

Demenzen stellen, im Hinblick auf den demographischen Wandel moderner Industriegesellschaften, ein ernstzunehmendes soziales und gesundheitsökonomisches Problem dar. Durch die starke Assoziierung der Inzidenz von Demenz und Alter ist eine Aggravation der Folgen nicht nur für Europa, sondern auch weltweit zu erwarten (Brookmeyer, Johnson et al. 2007, Organization 2012). Dem überwiegenden Anteil diagnostizierter Demenzen liegt die Alzheimer-Demenz mit 60-80% der Fälle zugrunde (Bermejo-Pareja, Benito-León et al. 2008). Effektive Therapiestrategien, die zu einer Reversibilität der Pathologie führen und somit eine Heilung versprechen könnten, fehlen bisher jedoch (Schneider 2013). Die wenigen Medikamente, die zur Therapie des M. Alzheimer zugelassen sind, bewirken eine Hemmung der Acetylcholinesterase oder Modulation des Glutamat-Stoffwechsels. In der S3-Leitlinie "Demenzen" der deutschen Gesellschaft für Neurologie und der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie werden bei leichter Demenz Acetylcholinesteraseinhibitoren und bei fortgeschrittenen Stadien die Gabe von NMDA-Antagonisten wie Memantin empfohlen. Bisher konnten diese Therapieansätze jedoch nur eine geringe progressionsverzögernde Symptomlinderung erreichen. Ein ursächlicher Heilungsansatz der Neurodegeneration wird damit nicht zu Grunde gelegt (Popp and Arlt 2011). Dennoch sind einige pathologische Prozesse der Alzheimer-Demenz bekannt und bieten so die Aussicht auf erfolgversprechende Interventionsmöglichkeiten (Hickman and El Khoury 2014).

1.1 Pathologische Prozesse der Alzheimer-Demenz – β -Amyloidopathie

Im Gehirn von Alzheimer-Erkrankten konnten viele verschiedene molekular pathologische Läsionen festgestellt werden. Die als prominenteste pathologische Veränderung liegt hierbei in der Ablagerung von fehlgefalteten Proteinen. Diese wurden bereits 1906 vom Erstbeschreiber der Erkrankung, Herr Dr. Alois Alzheimer, in der mikroskopischen Untersuchung des Gehirns von Frau Auguste Deter, entdeckt. Dabei zeigten sich Plaques und neurofibrilläre Strukturen in der gesamten Großhirnrinde. Diese Plaques enthalten dabei fehlentwickelte Nervenzellen und A β -Peptide, die aus 36-43

Aminosäuren bestehen. In hoher Konzentration sind diese Ablagerungen neurotoxisch und führen durch oxidativen Stress letztendlich zu einer neuroinflammatorischen Reaktion und synaptischer Fehlfunktion (Querfurth and LaFerla 2010). Dabei muss zwischen A β -38, A β -40 und dem *in vivo* stärker aggregierenden, toxischeren A β -42 unterschieden werden. Das Amyloid Precursor Protein (APP) gilt als Vorläuferprotein und wird in mehreren Schritten durch das beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzym 1 (BACE-1), sowie der β - und final γ -Sekretase durch jeweilige Abspaltungen zum A β -Peptid überführt (Haass and Selkoe 2007). Des Weiteren imponieren abnorme Ablagerungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein als neurofibrilläre Strukturen, die zumeist im mittleren Temporallappen des Gehirns zu finden sind (Kril, Patel et al. 2002).

Im Rahmen der Einführung dieser Arbeit möchte ich auf zwei weitere neuropathologische Prozesse des M. Alzheimer eingehen: Zum einen auf die Neuroinflammation im Wechselspiel mit der oben geschilderten β -Amyloidopathie, und zum anderen auf die Tauopathie, deren Aggregation von phosphoryliertem Tauprotein ein weiteres Kennzeichen der Alzheimer-Demenz darstellt.

1.2 Neuroinflammation in Zusammenschau der Alzheimer-Demenz

Neuroinflammatorische Prozesse sind sowohl bei demenziellen und malignen, als auch bei traumatischen Erkrankungen oder Multipler Sklerose an der Entstehung beteiligt. Die Neuroinflammation ist ein komplexer Prozess, der auf zellulärer Ebene mit der Aktivierung von Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem beginnt. Hierbei werden gefährdende, bzw. pathogene Strukturen von Mikrogliazellen erkannt. Diese werden dann über verschiedene Mediatoren gebunden und in einem endständigen Prozess phagozytiert. Normalerweise wird dadurch die Integrität der anliegenden Astrozyten gestärkt und es kommt in der Folge zu einer Funktionsverbesserung (Heneka, Carson et al. 2015). Dieser Mechanismus kann bei der Pathologie des M. Alzheimer jedoch so verändert sein, dass es zu einer Aufrechterhaltung der Inflamationsreaktion kommt. Positive Feedback Schleifen der Neuroinflammation auf die Expression der β -Amyloid Plaques spielen hier beispielsweise eine Rolle. Die Folge ist eine nicht enden wollende Entzündungsreaktion, unter der

Beteiligung von Zytokinen und anderen Mediatoren, die dann zu dysfunktionalen Mikrogliazellen im Bereich von Plaqueaggregaten führen. Das bei der Aktivierung von Gliazellen hochregulierte Translokatorprotein könnte in frühen Alzheimer Stadien eine Rolle spielen und ist deshalb eine attraktive Zielstruktur von PET-Tracern (Heneka, Carson et al. 2015). Darüber hinaus wurde in einigen Fällen der Alzheimer-Erkrankung eine Störung des β -Amyloid Abbaus nachgewiesen. Das Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von $A\beta$ -Amyloid scheint somit auch eine Komponente dieser Pathologie zu sein (Mawuenyega, Sigurdson et al. 2010). Die Möglichkeiten der Intervention durch eine Modulierung der Mikrogliazellen und deren Verhalten wären besonders im Bereich des Abbaus von Plaques interessant. So haben Cramer et al. durch die Applikation des Wirkstoffes Bexaroten an transgenen Mäusen eine Erniedrigung von löslichem $A\beta$ -Amyloid im Liquor erreichen können (Cramer, Cirrito et al. 2012). Bexaroten wirkt hierbei mittelbar als Induktor des am Abbau von β -Amyloid beteiligten Apolipoprotein-E. Jedoch konnten diese Ergebnisse nicht vollständig reproduziert werden. Besonders in anderen Mausmodellen zeigte sich keine Verbesserung der Plaquelast (Price, Xu et al. 2013).

1.3 Tauopathie

Hyperphosphoryliertes Tauprotein, das sich zu gepaarten helikalen Filamenten (PHF) und weiter dann zu neurofibrillären Ablagerungen (NFT) ansammelt, ist in den Hirnläsionen von Alzheimer-Erkrankten zu finden. Ob die Ansammlung von NFT oder schon die Hyperphosphorylierung von Tau ursächlich für die Entstehung synaptischer Fehlfunktionen ist, bleibt bisher Gegenstand weiterer Forschung. Tatsächlich gibt es sogar Hinweise auf eine neuroprotektive Funktion dieser Aggregate (NFT), da abnorme, hyperphosphorylierte Tau Moleküle einen zytotoxischen Effekt haben können (Lee, Perry et al. 2005). Denn obwohl NFT bisher nicht mit dem Verlust von Neuronen korrelieren, ist die Ansammlung von Tauproteinen ein wichtiges Kennzeichen der Alzheimer Krankheit (Arriagada, Growdon et al. 1992). Darüber hinaus gibt es Evidenz (Götz, Chen et al. 2001), welche $A\beta$ -Plaques eine akzelerierende Akkumulation von NFT zuschreibt. So werden die diagnostischen Level

hyperphosphorylierter Tauproteine und das absolute Maß an Tau im Liquor zur Diagnostik der Alzheimer Krankheit genutzt. Diese korrelieren dabei positiv und erlauben eine gute Vorhersage in vorklinischen Stadien wie leichter kognitiver Beeinträchtigung (Mild Cognitive Impairment [MCI])(Herukka, Hallikainen et al. 2005, Oddo, Vasilevko et al. 2006). Um den Zusammenhang zwischen der Entstehung von Tau-Ablagerungen, A β -Plaques und der zeitlichen Zuordnung von Symptomen des MCI zu verstehen, ist die bildgebende Diagnostik von fundamentaler Bedeutung.

1.4 PET Diagnostik des M. Alzheimer

Um eine möglichst frühzeitige, trennscharfe und nicht invasive Diagnostik der Alzheimer-Demenz zu erreichen, gewinnen bildgebende Verfahren seit etwa einer Dekade zunehmend an Bedeutung. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bietet dabei den Vorteil, molekulare Strukturen mittels radioaktiv markierter Bindungsstoffe (Tracer) *in vivo* darstellen zu können. Der PET kommt dabei die besondere Bedeutung zu, longitudinale Untersuchungen anzustellen, da sich die Ausprägung der Pathologie in den unterschiedlichen Organismen über die Zeitachse hinweg stark verändert. So kann der *in vivo* Verlauf diagnostisch beurteilt werden und abschließend durch histologische Sicherung des neuropathologischen Korrelats die Validierung der Bildgebung erfolgen.

Als einer der ersten Tracer wurde ^{18}F Fluordesoxyglucose (^{18}F -FDG) eingesetzt. Diese Substanz verhält sich im Körper des Menschen wie Glucose und nimmt so am neuronalen Stoffwechsel teil. Patienten mit einer Alzheimer-Demenz weisen in bestimmten Hirnarealen einen ^{18}F -FDG Hypometabolismus auf. Neu entwickelte Fluor-markierte Radiotracer ermöglichen es nun, β -Amyloid spezifisch abbilden zu können. So sind beispielsweise ^{18}F -Florbetaben (^{18}F -FBB), ^{18}F -Florbetapir und ^{18}F -Flutemetamol von der amerikanischen- (FDA) und europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zugelassen, welche sich durch eine gute Affinität für β -Amyloid auszeichnen (Harada, Okamura et al. 2018).

Ein weiter Ansatz ist das Abbilden der Neuroinflammation, die essenziell an der Entwicklung der Alzheimerschen Erkrankung beteiligt ist. Dabei wird das sogenannte Translokatorprotein (TSPO), dessen Expression bei Inflammation hochreguliert wird, markiert. Frühe TSPO-Tracer wie

beispielsweise ^{11}C -PK11195 konnten neuroinflammatorische Vorgänge visualisieren (Edison, Archer et al. 2008). Auffälligkeiten konnten zudem durch den synergistischen Einsatz von ^{18}F -FDG und ^{18}F -FBB entdeckt werden. Hier zeigte sich bei Patienten mit MCI ein Hypometabolismus des ^{18}F -FDG mit starker örtlicher Korrelation von ^{18}F -FBB. Ein Zusammenhang zwischen Veränderungen des Glucosestoffwechsels und der β -Amyloid Last lässt sich damit ableiten. Darüber hinaus wurde nach Gabe von ^{11}C -PK11195 und ^{11}C -Pittsburgh Compound-B (^{11}C -PIB), dem ersten Amyloid-Tracer, ein ähnliches PET Muster gefunden (Yokokura, Mori et al. 2011). Diese Daten suggerieren den lohnenswerten Einsatz von TSPO-Tracern im Bereich der Alzheimer-Diagnostik. Im Gegensatz zur Amyloid Bildgebung wurden PET-Tracer um hyperphosphoryliertes Tau-Protein oder NFT zu erfassen erst nach und nach entwickelt. Da bei der Alzheimer-Demenz Bereiche mit hohem Plaque-Anteil ebenfalls mit NFTs korrelieren, stellt dies eine besondere Schwierigkeit für die Bildgebung dar (Maruyama, Shimada et al. 2013). Bisher ist die Tau-PET daher noch kein fester Teil des diagnostischen Algorithmus des M. Alzheimer. Sie bleibt jedoch ein attraktives Ziel der Forschung zur Früherkennung der verschiedenen Proteinablagerungserkrankungen (Leuzy, Chiotis et al. 2019). So werden mit beispielsweise ^{18}F -AV1451 immer neuere Tau-Tracer getestet, die eine verbesserte spezifische Bindung an NFT zeigen (Zhao, Liu et al. 2019).

1.5 Mausmodelle mit Alzheimer-Pathologie

Bisher ist eine Vielzahl genetischer Mutationen bekannt, die an der Entstehung von Alzheimer-Demenz beteiligt sind. Diese werden vor allem im präklinischen Rahmen zur Erzeugung gentechnisch modifizierter Maus- und Rattenmodelle genutzt. So nutzt man genetische Aberrationen des Apolipoprotein-E-, Presenilin-, APP- oder auch Modelle, die zu einer erhöhten Ansammlung von phosphoryliertem Tau führen, um verschiedene Wege der Pathologie abzubilden. Auch wenn in der Vergleichbarkeit von murinen Modellen und der Manifestation im Menschen eine Limitation besteht, muss doch beachtet werden, dass die Pathologie vom humanen Genom stammt und damit einen spezifischen Teil des pathologischen Prozesses abbildet. Der PET kommt dabei die besondere

Bedeutung zu, longitudinale Untersuchungen anzustellen, da sich die Ausprägung der Pathologie in den unterschiedlichen Organismen über die Zeitachse hinweg stark verändert. So kann der *in vivo* Verlauf diagnostisch beurteilt werden und abschließend durch histologische Sicherung des neuropathologischen Korrelats die Validierung der Bildgebung erfolgen.

Ein etabliertes und auch für unsere Studie genutztes Modell stellen PS2/APP Mäuse dar. Dieses transgene Tiermodell ist sowohl für Presenilin-2 (PS2) als auch für das humane Amyloid Precursor Protein (APP) homozygot. PS2/APP Tiere bilden ab dem 5.- bis 6. Lebensmonat erste Plaques, die sich über die Lebensspanne hinweg besonders in den kortikalen und hippokampalen Anteilen des Gehirns zeigen (Richards, Higgins et al. 2003, Ozmen, Albientz et al. 2009). Anderweitig existieren im Bereich der Tauopathien viele unterschiedliche Kleintiermodelle mit Genmutationen, die zu verschiedenen phosphorylierten Tauablagerungen in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns führen (Zimmer, Leuzy et al. 2014). Im Rahmen unserer Studie untersuchten wir deshalb zwei verschiedene Mausmodelle mit einem Tau-Tracer. Dabei wurde eine humane Taumutation der P301S Mäuse und eine bigenetische Tau- und Glucosemutation (biGT) bei biGT Tieren genutzt. P301S Tiere zeigen bereits ab 6 Monaten neurologische Symptome entsprechend einer Paraparese, die auf eine deutliche Tauopathie mit humanen Tauablagerungen zurückzuführen ist. Sie exprimieren dabei humane hyperphosphorylierte Tausoformen (Allen, Ingram et al. 2002). Das biGT Mausmodell zeigte hier ein verlängertes Überleben, das sich durch eine Reduktion von Tauablagerungen aus der P301L Mutation im Hirnstamm erklärt (Crespo-Biel, Theunis et al. 2014). Diese Besonderheit wird durch die Mutation der GSK-3 β Glucosemutation erklärt, welche zu einer differenten Distribution von NFTs führt. Daher eignet sich dieses Modell gut für longitudinale Studien (Terwel, Muyllaert et al. 2008).

1.6 Kleintier PET Studien zur Detektion von Amyloidablagerung, Neuroinflammation und Tauopathie

Bisherige Kleintier PET Studien evaluieren die optimale Darstellung pathologischer Zielstrukturen im Hinblick auf eine möglichst spezifische Bindung des Tracers. Die A β -Amyloid Bildgebung ist, wie bereits oben erwähnt, ein mittlerweile gut etabliertes und breitflächig eingesetztes Verfahren, um die Plaquelast von Alzheimer-Patienten verfolgen zu können. In Kleintier-PET Studien wurden bereits etablierte Tracer wie ^{18}F -Florbetaben und ^{18}F -Flutemetamol eingesetzt, um neue Mausmodelle vergleichend beurteilen zu können (Son, Jeong et al. 2018). Es kann dann ein optimaler Zielorganismus für eine spezifische Pathologie gefunden werden. Darüber hinaus lassen sich auch potenzielle Therapeutika evaluieren. So konnten Brendel et al. bei PS2/APP Mäusen mit einem BACE Inhibitor untersuchen inwieweit sich die A β -Plaquelast im Gehirn der Tiere verlangsamen oder sogar reduzieren lässt (Brendel, Jaworska et al. 2018).

An dieser Stelle muss allerdings eine Limitation zwischen PET Studien am Mausmodell und Alzheimer-Patienten beachtet werden. So ist ein Hypometabolismus von ^{18}F -FDG bei an M. Alzheimer Erkrankten, Teil der Diagnose. Im murinen Modellorganismus jedoch kommt ein ^{18}F -FDG-Hypermetabolismus zur Darstellung (Poisnel, Hérard et al. 2012, Rojas, Herance et al. 2013). Dickens et. al. konnten anhand eines Mausmodells mit akuter zentralnervöser Neuroinflammation zeigen, dass ^{18}F -GE180 in potenter Weise aktivierte Mikrogliazellen in unterschiedlichen Arealen abbildet. Dies zeigte sich sowohl in weißer als auch grauer Substanz (Dickens, Vainio et al. 2014). Bei gleichzeitig niedriger unspezifischer Bindung an Knochenstruktur oder weißer Substanz zeichnet sich ^{18}F -GE180 durch ein hohes Bindungspotenzial an TSPO aus. ^{18}F -GE180 war hierbei dem anderen Tracer ^{11}C -(R)-PK11195 hinsichtlich des Bindungspotentials überlegen (Deussing, Blume et al. 2018). Bereits gut etablierte Tracer wie ^{11}C -PIB können in gemischten Bereichen von A β -Plaques und Tau-Fibrillen jedoch nur die Amyloid-Pathologie abbilden. Okamura et al. stellten mit THK-5117 und THK-5105 eine Möglichkeit bereit die Disposition von Tau-Fibrillen zu betrachten (Okamura, Furumoto et al. 2013). Dadurch ergibt

sich die Chance diesen weiteren Aspekt des M. Alzheimer präsentieren zu können. Durch Autoradiographie und weiterer *in vitro* Methodik kann mit ^{18}F -THK5117 zudem die Diskrepanz von *in vivo* ^{18}F -FDG-PET Ergebnissen und der *in vitro* Tau-Distribution unterschieden werden (Lemoine, Saint-Aubert et al. 2015).

2. Inhalte und Eigenanteil der Promotionsarbeit

2.1 PET-Bildgebung von Gliazellaktivierung, Amyloidablagerung und Glucose

Metabolismus am PS2/APP-transgenen Mausmodell

Im ersten Teil meiner Promotionsarbeit wurden an einem bereits etablierten Mausmodell drei unterschiedliche PET-Tracer longitudinal untersucht. Die zuvor beschriebenen transgenen PS2/APP Mäuse wurden im Alter von 5, 8, 13 und 16 Monaten der Kleintier PET Bildgebung zugeführt. Dem Abbilden des zeitlichen Ablaufs und des Wechselspiels aus Glucosemetabolismus, Neuroinflammation und A β -Plaquebildung galt dabei der Hauptfokus. Nach Anfertigung der PET Untersuchungen wurden die Bilddateien systematisch ausgewertet. Zunächst musste die rigide manuelle Co- Registrierung der Rohdaten auf ein anatomisches Template erfolgen, welches auf einem zuvor erhobenen murinen kranialen Magnetresonanztomographie-Atlas basiert. Die verschiedenen Bilddaten wurden anschließend aufsummiert um ein dreidimensional normalisiertes Template für den jeweiligen Tracer zu bilden. Die Normalisierung der Daten nutzte dabei das Kleinhirn als Referenzstruktur. Die weitere Analyse der Daten erfolgte nach einem zuvor definierten Protokoll, welches statistisches parametrisches Mapping (SPM) beinhaltet. Wir testeten ebenfalls eine ovale VOI, die räumlich über dem Cerebellum platziert wurde. Zur Normierung der jeweiligen pathologisch veränderten Zielstrukturen definierten wir verschiedene Volumina (Volume of Interest, VOI). Hierbei sollten das Cerebellum (CBL) sowie die weiße Substanz als Referenzstruktur (White Matter) und der frontale Kortex (Forebrain) als Zielstruktur (ROI; Region of interest) dienen. Auf Basis unserer bisherigen Erfahrungen nutzten wir das gesamte Cerebellum zur Skalierung von ^{18}F -FDG. Die Referenzregion (White Matter, 67mm^3) für ^{18}F -Florbetaben setzte sich aus Teilen des Pons, Mittelhirns, Rombencephalons sowie Teilen der subkortikalen weißen Substanz zusammen. Diese Referenzregion zeigte sich der des Cerebellums überlegen. Für den Radiotracer ^{18}F -GE180 ergab sich jedoch die Schlüsselfrage nach einer pathologiefreien Referenzregion der Neuroinflammation. Dies lösten wir indem wir eine Pseudoreferenzregion im Bereich des Cerebellums definierten (**Abb. 1***). Dank neuerer

Ergebnisse von Lyoo et al. testeten wir verschiedene VOI auf deren Vergleichbarkeit von transgenen Tieren und Wildtypen. Eine Referenzregion der weißen Substanz von Hirnstamm und Cerebellum (29mm^2) erwies sich für beide Gruppen als robust (Lyoo, Ikawa et al. 2015).

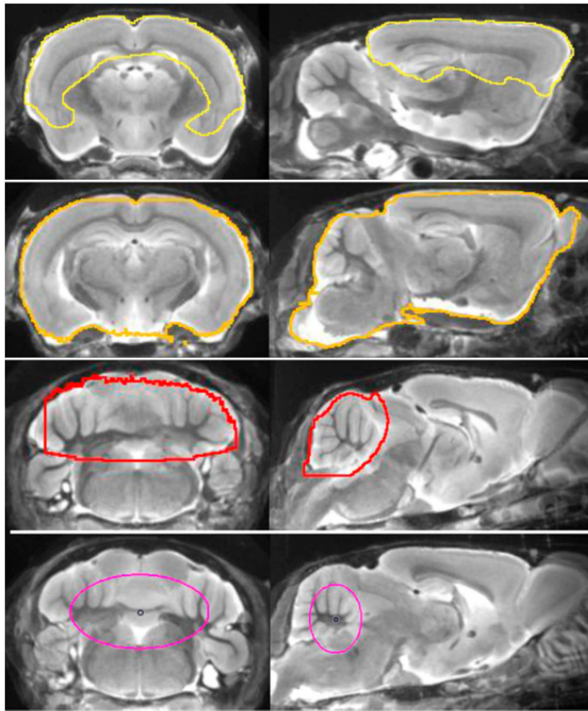


Abbildung 1*: Definitionen von Vorderhirn (gelb), Gesamthirn (orange), Kleinhirn (rot) und weißer Substanz des Hirnstamms/Cerebellum (lila) Zielvolumina auf dem MRT-Atlas des Mausgehirnes im coronaren und sagittalen Schnitt.

Im Gegensatz zu ^{18}F -FDG und ^{18}F -Florbetaben musste für ^{18}F -GE180 jedoch noch das optimale statische Zeitfenster für die Auswertung der Region of Interest (ROI) gefunden werden. Durch Vorgängerarbeiten sind die optimalen statischen Zeitfenster für ^{18}F -Florbetaben und ^{18}F -FDG bekannt (Rominger, Brendel et al. 2013). In der Folge wurden, nach der Applikation von ^{18}F -GE180 über die Schwanzvene der Tiere, Bilder im micro-PET von 0-90 min. angefertigt. Diese wurden im Anschluss sowohl dynamisch, als auch in verschiedenen Zeitfenstern (0-30 min., 30-60 min., 60-90 min.) ausgewertet. Wir konnten zeigen, dass ein statischer Analysezeitpunkt von 60-90 min. keinen signifikanten Unterschied zur dynamischen Analyse aufzeigt (**Abb. 2***).

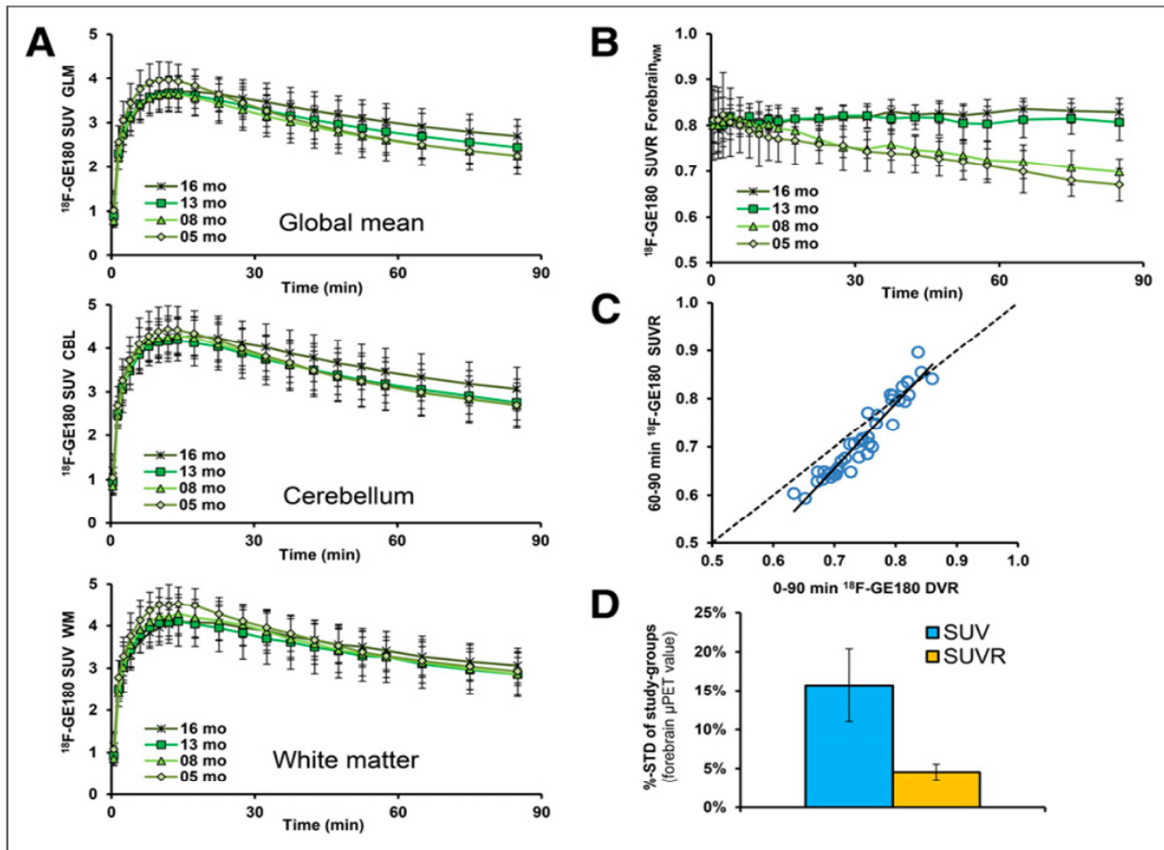


Abbildung 2*: Zeitaktivitätskurven des SUV der dynamischen 90 Minuten Messung mit ^{18}F -GE180 an den vier Altersgruppen von PS2/APP Mäusen: (A) Jeweilige drei Referenzregionen: Gesamthirn (global mean), Kleinhirn (Cerebellum), Weiße Substanz (White matter). (B) SUVR (\pm Stabw.) aus Zielvolumina zu Referenzregion (frontaler Cortex/Weißer Substanz). (C) Korrelation der Distributionsverhältnisse aus dem statischen 60-90 min. Zeitfenster und der dynamischen 90 min. Messung mit ^{18}F -GE180, wobei die DVR der SUVR entspricht. Die gepunktete Linie stellt dabei eine perfekte Übereinstimmung von 1 dar. (D) Stabilitätsberechnung der ^{18}F -GE180 micro-PET Scans aller 8 transgenen und Wildtyp Gruppen von frontalem Kortex (blau) und Pseudoreferenzregion (orange), skaliert aus den SUV Verhältnissen in Prozent (%-SD mean) mit mittlerer Standardabweichung.

Eine deutliche Zunahme der Signalstärke im longitudinalen Verlauf stellte sich besonders anschaulich zwischen 8- und 13 Monate alten PS2/APP Tieren dar. Jedoch zeigten bereits 5 Monate alte Tieren eine signifikante Steigerung der Traceraufnahme um + 9% ($P < 0,005$). Dieser Trend setzte sich bei den 16 Monate alten Tieren fort, welche eine +25% ($P < 0,001$) höhere Aufnahme im Vergleich zu den altersangepassten Wildtypen zeigten (**Abb. 3***).

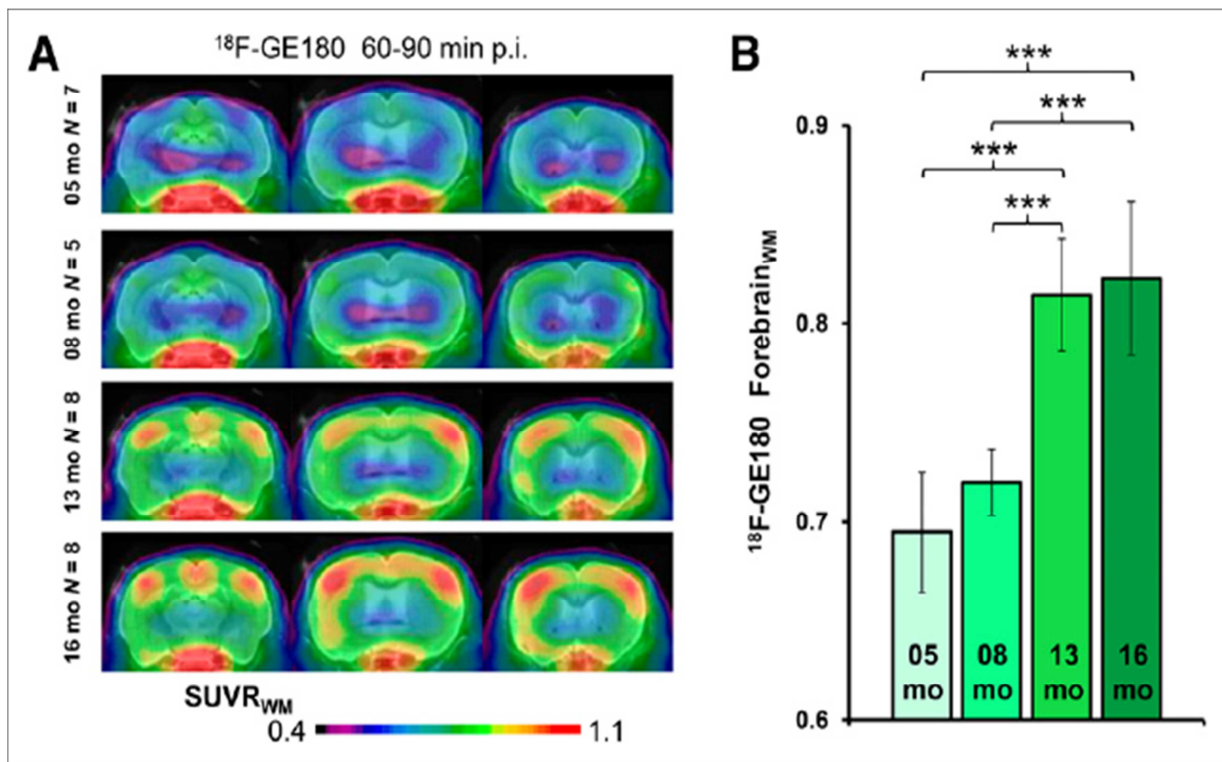


Abbildung 3*: (A) ^{18}F -GE180 Aufnahmen von 60-90min. p.i. der SUVR Mittelwerte, dargestellt in koronaren Schnittbildern der micro-PET Scans verschiedener Altersstufen; projiziert auf den MRT Mausatlas. (B) In unterschiedlichem Alter der PS2/APP Tiere kalkulierte SUVR Mittelwerte mit Standardabweichung (+SD). Signifikante Unterschiede für $P < 0,001$ mit *** markiert. In einfacher Varianzanalyse.

Wir konnten einen signifikanten örtlichen und zeitlichen Zusammenhang der normierten Aufnahmekonzentrationswertverhältnisse (SUVR) in der Bildgebung mit ^{18}F -Florbetaben und ^{18}F -GE180 demonstrieren. Besonders ab einem Alter von 13- und 16 Monaten zeigten die PS2/APP transgenen Versuchstiere im Bereich des frontalen Kortex eine gemeinsame Korrelation (**Abb. 4***). Im Hinblick auf das Wechselspiel von ^{18}F -Fluorodesoxyglucose mit ^{18}F -Florbetaben oder ^{18}F -GE180 ergaben sich jedoch keine ähnlich starken Korrelationen. Eine Erhöhung des Glucosemetabolismus könnte der neuronalen Entzündung durch Gliazellaktivierung geschuldet sein.

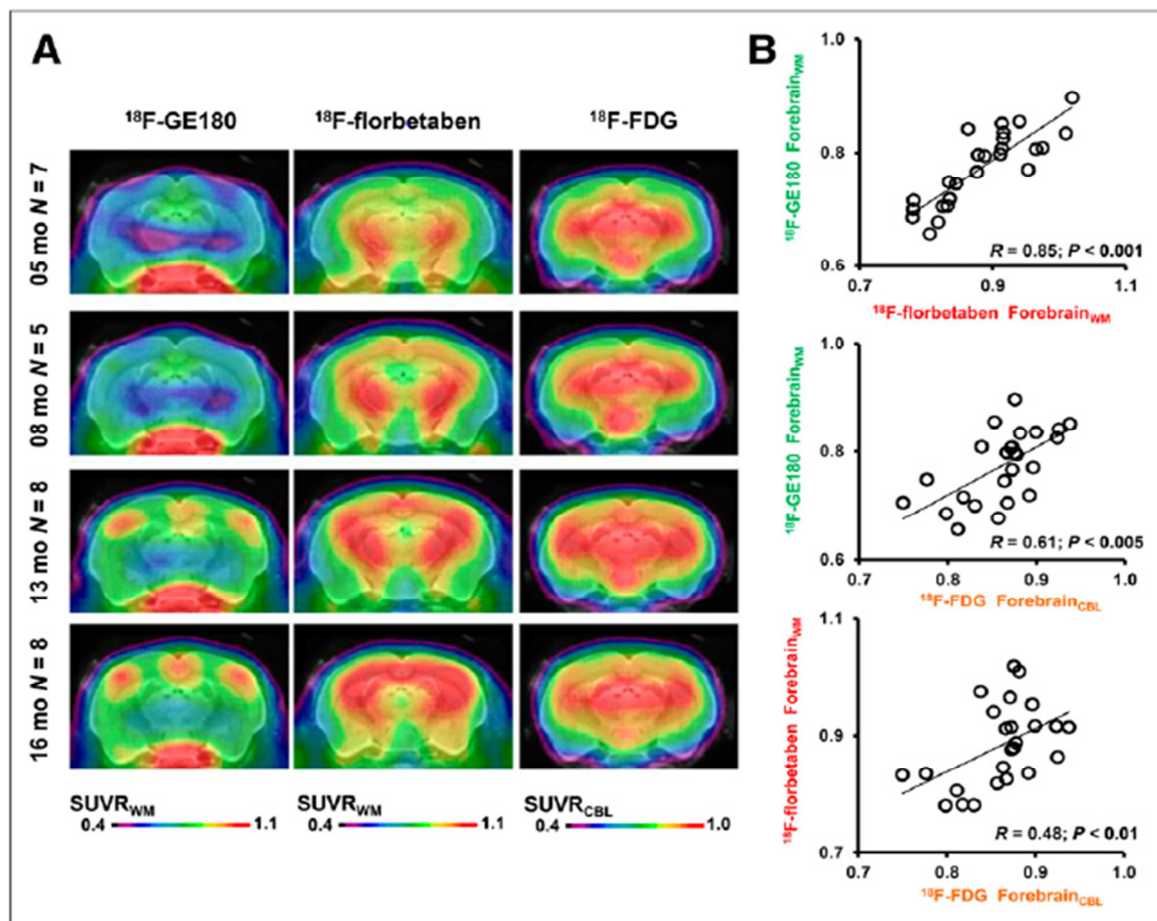


Abbildung 4*: Für PS2/APP Tiere: (A) Koronare Schnitte der Mittelwerte SUVR Abbildungen aller drei verwendeten Radiotracer zu den jeweiligen Altersstufen der Tiere. Diese sind auf den MRT Mausatlas projiziert. (B) Jeweilige Korrelationen aus den unterschiedlichen Radiotracern der berechneten SUVR von frontalem Kortex zu Pseudoreferenzregion.

Nachfolgend durchgeführte histopathologische Untersuchungen, mit IBA-1 Antikörper *in vitro* quantifiziert, zeigten eine gute, positive Korrelation mit den *in vivo* gewonnenen ¹⁸F-GE180 Aufnahmen ($R = 0,61$; $P < 0,005$). Zudem zeigte sich die prozentuale Plaqueload in der Methoxy-X04 Färbung und die Signalstärke von ¹⁸F-Florbetaben hoch korrelierend ($R = 0,80$; $P < 0,001$).

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass die Bildgebung mit ¹⁸F-GE180 eine potente Möglichkeit bietet neuroinflammatorische Prozesse longitudinal und *in vivo* detektieren zu können. Der Einsatz mehrerer Tracer stellt zudem einen sinnvollen synergistisch-diagnostischen Ansatz dar. Hier zeichnet

sich die Chance ab Interventionsmöglichkeiten, wie die Modulation der A β -Plaquelast, besser evaluieren zu können.

Diese Ergebnisse der geteilten Erstautorenschaft "*Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model: A Triple-Tracer PET Study*" wurden im Journal of Nuclear Medicine publiziert.

2.2 PET-Bildgebung der Tau-Pathologie mittels ^{18}F -THK5117 in zwei transgenen Mausmodellen

Ein weiteres pathophysiologisches Korrelat des Morbus Alzheimer ist hyperphosphoryliertes Tau-Protein, organisiert in neurofibrillären Bündeln (NFT). Bei genauerer Betrachtung der derzeitigen Studienlage zur Detektion von NFT *in vivo* kommt man zu dem Schluss, dass es bisher nur wenige Tau-spezifische Tracer gibt (Villemagne, Fodero-Tavoletti et al. 2015).

Im Rahmen meiner Zweitautorenschaft "*Small-Animal PET Imaging of Tau Pathology with ^{18}F -THK5117 in 2 Transgenic Mouse Models*" widmete ich mich einer Evaluierungsstudie des Tau-Tracers ^{18}F -THK5117 an zwei transgenen Mausmodellen. Hierbei galt es, neben der Neuroinflammation und A β -Plaquebildung auch die Tau-Bildgebung zu etablieren, um zukünftig beispielsweise Monitoring von Therapiestudien in diesem Bereich zu ermöglichen. Okamura et al. entwickelten mit einem neuen Arylquinolinderivat die vielversprechende Möglichkeit an NFT mit hoher Spezifität binden zu können (Okamura, Furumoto et al. 2013). Sowohl *in vitro* Bindungstests als auch Autoradiographien bestätigen diese Spezifität als robust. Das Distributionsmuster von ^{18}F -THK5117 zeigte sich stark unterschiedlich zum eher auf A β -Plaques ausgerichteten ^{11}C -PIB. Um diese Ergebnisse der präklinischen Forschung zugänglich zu machen, testeten wir ^{18}F -THK5117 an den zwei oben beschriebenen transgenen Versuchstierreihen (P301S und biGT), sowie C57Bl/6 Tieren als Vergleichsgruppe. PET-Aufnahmen von P301S Tieren (n=4) wurden im Alter von fünfeinhalb und 8 bis 11 Monaten (n=7), sowie von jeweils korrespondierenden Wildtypen ab einem Alter von sechs Monaten angefertigt. Acht

biGT Tiere sind im Alter von 12- und 21 Monaten mit ^{18}F -THK5117 positronen-emissionstomographisch untersucht und entsprechenden Wildtypen bis zu einem Alter von 22 Monaten gegenübergestellt worden. Anschließend folgten autoradiographische *in vitro*-, sowie immunhistochemische Untersuchungen, um die PET Daten abschließend vergleichend zu sichern. Die PET-Aufzeichnungen einer Kohorte P301S Tiere und der korrespondierenden Wildtypen wurden zunächst dynamisch angefertigt (0-90 min. p.i.). Die Aufnahmen wurden, durch manuelles Starrkörper-Co-Registrieren mittels des PMOD Fusionstool (V3.5, PMOD Technologies Ltd.), auf einen MRT Bildatlas des murinen Craniums normalisiert. Hierbei sind die jeweiligen Bilddaten für den Durchführenden verblindet und anschließend durch einen zweiten erfahrenen Prüfer erneut justiert worden. Zunächst fertigten wir mit einer linearen Methode (Logan, Fowler et al. 1996) Bindungspotenziale an (BPnd). Diese wurden durch Analyse der Daten mittels statisch voxelbasierter parametrischer Abbildungen (SPM) der P301S Kohorte nach einem zuvor definierten Protokoll ermöglicht (Rominger, Brendel et al. 2013). Eine zerebelläre VOI diente dabei als Referenzregion, wohingegen die Zielgewebe (ROI; Region of interest) der P301S Tiere im Bereich des Hirnstamms (VOI Bst) lagen. Andererseits wurden als ROI der biGT Kohorte Teile der Amygdala und des entorhinaler Cortex (VOI ent) definiert (**Abb. 5****).

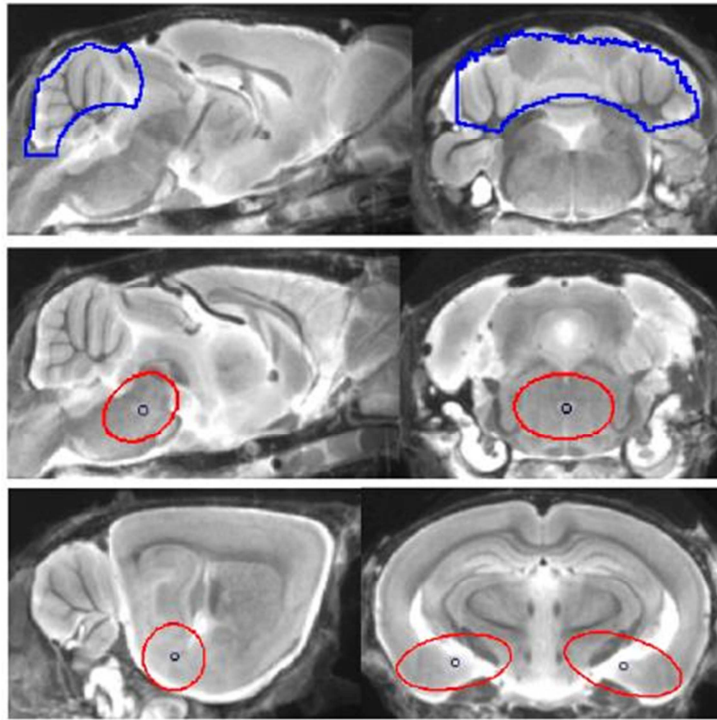


Abbildung 5:** Definitionen der zerebellären Referenzregion als Volumina (VOI) (**blau**), sowie des oval geformten Volumens als Zielregion (ROI) der P301S Tiere (**zweite Reihe rot**) im Bereich des Stammhirns und Anteilen des Pons und Mittelhirns. In dritter Reihe bilaterale sphärische Volumina über der Amygdala mit entorhinalen, sowie kortikalen Anteilen als Zielstruktur (ROI) der biGT Gruppe.

Die erhobenen Kalkulationen bestehen daher jeweils aus dem Verhältnis der standardisierten Aufnahmerelationen zwischen der P301S Gruppe (SUVR Bst/Cbl) und der biGT Kohorte (SUVR ent/Cbl). Anschließend erhobene Zeitaktivitätskurven des Hirnstamms, des Craniums der Harderischen Drüsen und des gesamten Hirns wurden ausgewertet um ein potenzielles statisches Zeitfenster für die nachfolgenden Bildaufnahmen etablieren zu können. Es zeigte sich hierbei, dass die Aufnahmeverhältnisse eines statischen Zeitfensters von 20 - 50 min. gut mit denen der vollständig dynamisch angefertigten korrelieren (**Abb. 6****).

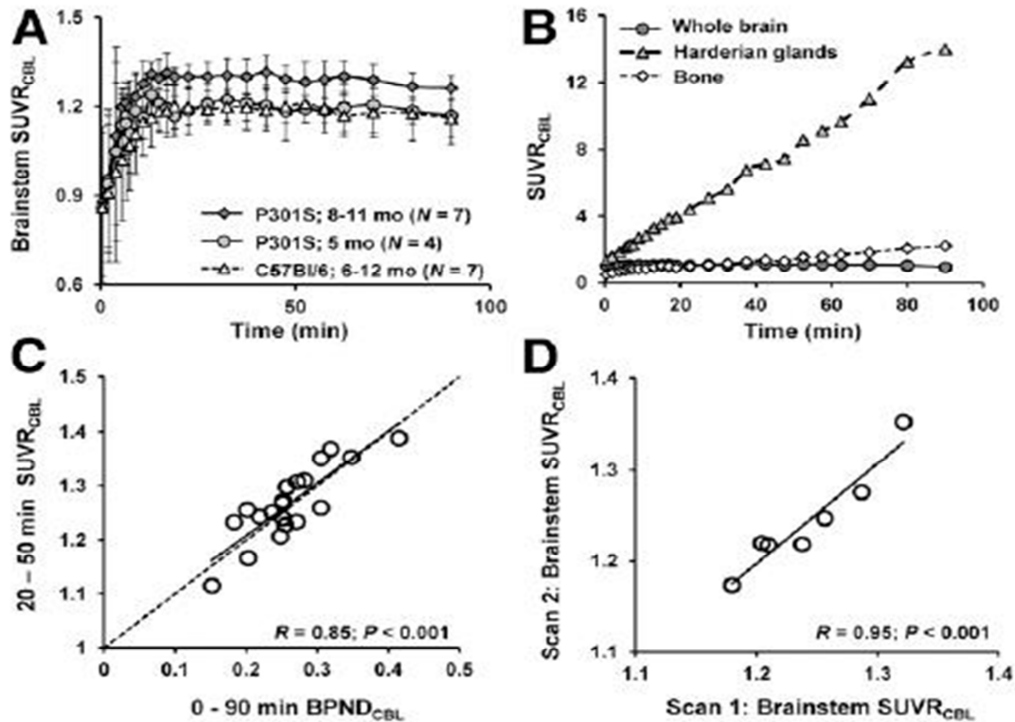


Abbildung 6:** Nach ^{18}F -THK5117 Applikation: (A) Zeitaktivitätskurven der standardisierten Aufnahme Verhältniswerte (SUVR) von Hirnstamm zu Cerebellum (Bst/Cbl) der verschiedenen Altersgruppen von P301S- und C57Bl/6 Mäusen. (B) Jeweilige Gewebe zu Referenzregion SUVR Werte in 4 getesteten wildtyp Tieren. (C) SUVR Korrelation der 20 – 50 min. statischen Aufnahmezeitfenster zu der dynamischen Messung für alle transgenen und wildtyp Gruppen. Die gepunktete Linie stellt dabei eine perfekte Übereinstimmung von 1 dar. (D) Dargestellte Test-Retest Korrelation von Hirnstamm zu Cerebellum SUVR im statischen 20 – 50 min. Zeitfenster.

Dieses statische Zeitfenster wurde auch für die nachfolgenden Aufnahmen der biGT Kohorte angewendet. Darüber hinaus, beobachteten wir bei älteren P301S Mäusen eine deutliche Signalzunahme im Bereich des Hirnstamms von +11% ($P < 0,001$), verglichen mit gepoolten Wildtypen. Diese Erkenntnis setzte sich ebenfalls in der Gruppe der biGT Tiere fort, da ein deutlicher Progress des Signals mit +14,9% ($P < 0,001$) in der VOI des Cortex und der Amygdala im Verhältnis zu denen entsprechender Wildtypen messbar war. (**Abb. 7****).

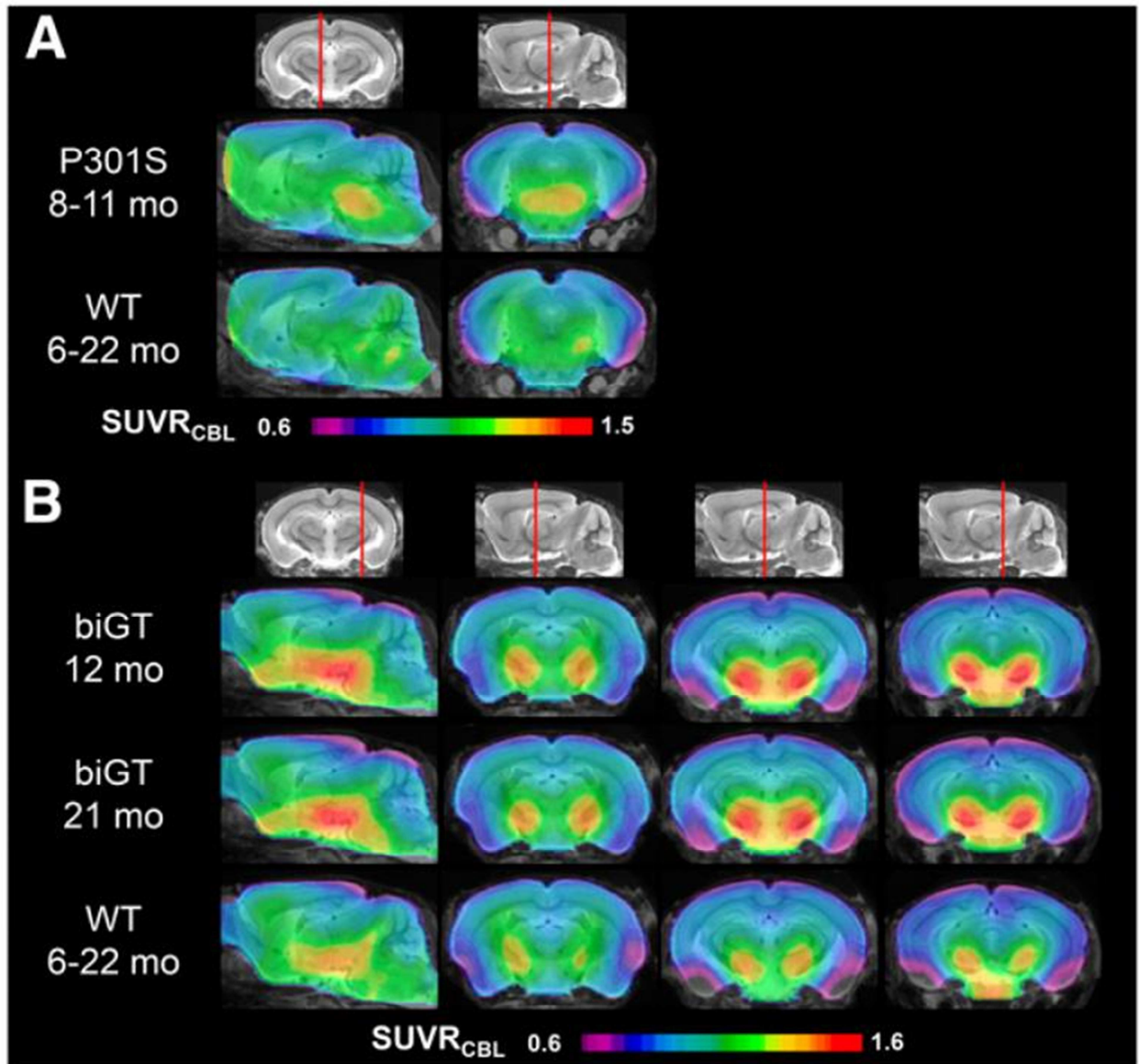


Abbildung 7:** Parametrisch gebildete Mittelwerte der standardisierten Aufnahme Wertverhältnisbilder (SUVR) in sagittaler und koronarer Bildgebung. Diese sind auf den murinen MRT Atlas projiziert. (A) ^{18}F -THK-5117 Aufnahme in P301S Tieren und der Kontrollgruppe. (B) ^{18}F -THK-5117 Aufnahme in jungen und alten biGT Mäusen und deren Kontrollgruppe.

Des Weiteren nutzten wir die bereits oben besprochene SPM Methode um einen voxelbasierten Vergleich des gesamten Hirns der transgenen Tiere und der jeweilig zugeordneten Wildtypen anfertigen zu können. Damit kann auch außerhalb definierter Zielvolumina eine statistisch relevante Signaländerung detektiert werden. Die anschließend durchgeführte immunhistochemische Validierung der Ergebnisse bestätigte die zunehmende Tau-Ablagerung im Hirnstamm der P301S-Mäuse. Dazu wurde mittels AT8 eine Färbung des Gehirns von jeweils zwei P301S- und biGT Tieren durchgeführt. (**Abb. 8****). Sowohl die *ex vivo*- wie auch die *in vitro* Autoradiographien wurden mit korrespondierenden Bilddaten abgeglichen.

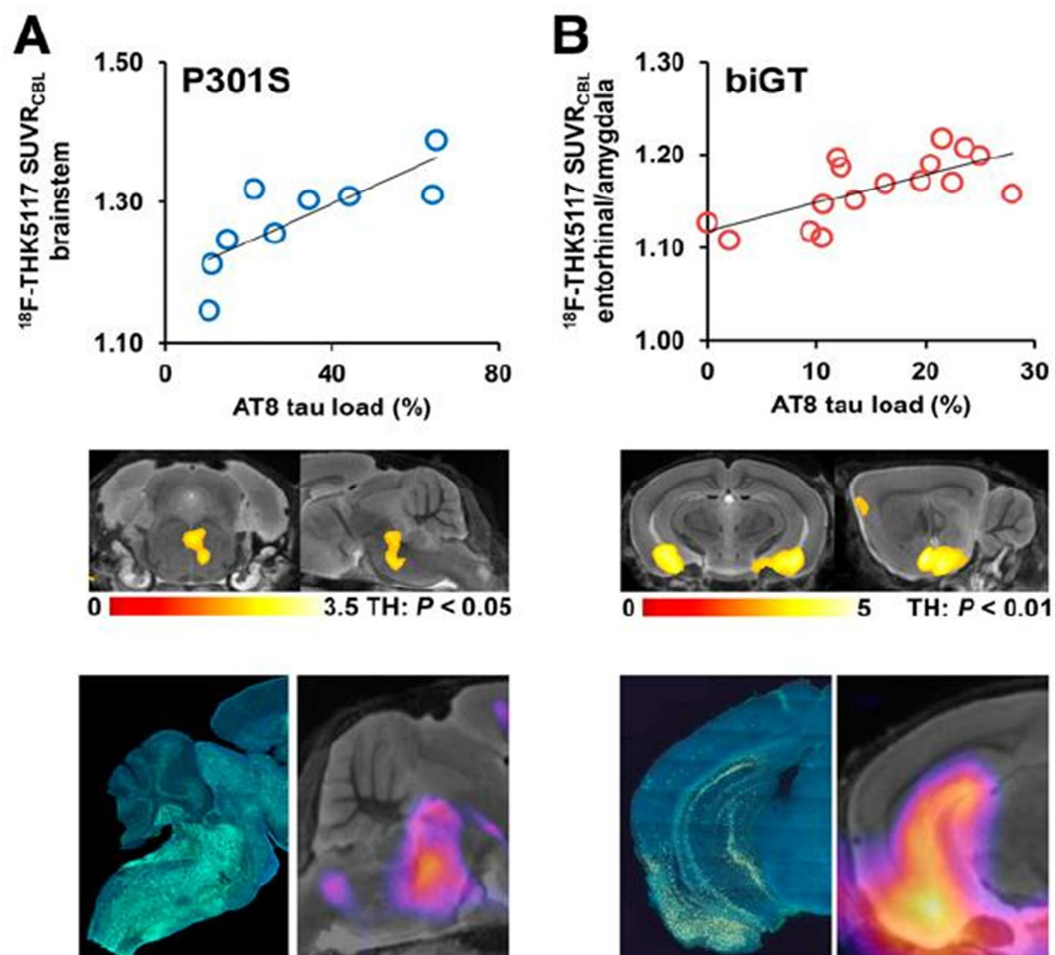


Abbildung 8:** Immunhistochemische Validierung der Ergebnisse der ^{18}F -THK5117 PET Bildgebung mittels *in vitro* AT-8 Anfärbung für die P301S Gruppe (A) und die biGT Gruppe (B). Dabei bilden die Graphen die jeweilige Korrelation zwischen den korrespondierenden Teilbereichen der AT-8 Anfärbung und der Tau-Protein Last (in %) und des standardisierten Aufnahme Wert Verhältnis (SUVR) mit ^{18}F -THK5117 ab. In der mittleren Reihe ist die

lineare Regression durch die SPM-Methode zwischen Tau-Last in Prozent und der micro-PET Daten (SUVR) mit ^{18}F -THK5117 dargestellt (unkorrigiert für mehrere Vergleiche, $k > 20$ voxel). Die untere Reihe veranschaulicht die AT-8 Anfärbungsschnitte mit deren individuellen z-Ergebnis Kartenausschnitt; projiziert auf den MRT Atlas.

Auch mit kaltem Tracer konnten wir eine entsprechende Blockierung der *in vitro* Autoradiographie erreichen (**Abb. 9****). Jedoch ergaben sich im Hinblick auf das Aufnahmezeitfenster und die Referenzregion Limitationen. So mussten wir die zerebelläre Referenzregion nach immunhistochemischer Auswertung korrigieren, da es in den zerebellären Pedunkeln einzelner P301S Mäuse zur Ablagerung phosphorylierten Tau-Proteins kam. Dies hätte die Auswertungsverhältnisse des Bindungspotenzials der VOI beeinflussen können. Zudem beobachteten wir in der dynamischen Anfertigung der Aufnahmemuster ein vergleichsweise frühes Erreichen des Konzentrationsplateaus von



Abbildung 9**: sagittaler Schnitt der murinen entorhinalen Hirnregion einer 21 Monate alten biGT Maus.

(links) AT-8 Anfärbung NFT sagittaler Schnitt entorhinal. (mitte) *ex vivo* Autoradiographie desselben sagittalen entorhinalen Schnitts. (rechts) *ex vivo* Autoradiographie nach Blockierung mit kaltem THK5117.

^{18}F -THK5117 ab ca. 15 min p.i.. Hier zeigte sich ebenfalls eine zeitlich longitudinale Anreicherung im frontalen Cranium und der Harderischen Drüsen (**Abb. 8 (B)**). Besonders in späteren Zeitfenstern könnte dies einen signifikanten Einfluss haben. In Anbetracht der hohen quantitativen Tau-Belastung in den histopathologischen Untersuchungen, stellt sich die Nachweisschwelle von 10% in der PET Bildgebung als relativ hoch heraus. Folglich lässt sich die *in vivo* Diagnostik besonders bei älteren Tieren valide nutzen. Für etwaige Therapiestudien sollten jedoch weitere Verbesserungen der Affinität des Tracers erreicht werden, um schon früh dezente Anreicherungen von Taufibrillen abzubilden.

2.3 Beitrag zu den Veröffentlichungen

Beitrag zu Veröffentlichung I

Im Rahmen meiner geteilten Erstautorenschaft der Veröffentlichung „Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model: A Triple-Tracer PET Study“ widmete ich mich zunächst der Akquirierung der Rohdaten der ^{18}F -Florbetaben-, ^{18}F -FDG- und ^{18}F -GE180 PET-Bildgebung. Anschließend prozessierte ich die Datensätze der ^{18}F -Florbetaben-, ^{18}F -FDG und ^{18}F -GE180 Bilder mit dem Programm PMOD und führte die SUV-Berechnungen, die Normalisierung, die Partialvolumeneffektkorrektur sowie die zur Qualitätskontrolle erforderlichen visuellen Überprüfungen der prozessierten Daten durch. Dies gestaltete sich zunächst herausfordernd, da Bilddaten die mittels ^{18}F -GE180 angefertigt wurden eine neue Möglichkeit zur Erfassung neuronaler Entzündung waren. Somit war insbesondere die Suche nach einer pathologiefreien Referenzregion interessant, da ich hier die voxelbasierten Analysen durchführte. Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete die statistischen Analysen der SUVR Ergebnisse. Diese erfasste ich in Tabellen und visualisierte sie anschließend in Graphen und Diagrammen. Anschließend widmete ich mich der Literaturrecherche und dem Verfassen des englischsprachigen Textes der aus den untersuchten Daten entstandenen Veröffentlichung. Da zwar Teilaspekte der Amyloidpathologie bekannt sind, hier allerdings die Zusammenhänge zwischen Glucosestoffwechsel, Amyloidablagerung und der neuronalen Entzündung untersucht wurden, gestaltete sich die Suche nach geeigneter Literatur zunächst schwierig. Gerade die potenziellen Mechanismen der Beeinflussung pathophysiologischer Prozesse, wie z.B. der neuronalen Entzündung auf die Entstehung und den Prozess des Amyloidstoffwechsels konnten bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. In der Aufarbeitung dieser hoch-spezifischen Fragestellung und bei der Formulierung der Publikation, sowie bei der Präsentation der Ergebnisse auf der 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin unterstützte mich der zweite Erstautor der Veröffentlichung, Dr. med. Matthias Brendel, entscheidend.

So konnte ein hoher wissenschaftlicher Standard bei der Erschließung dieser anspruchsvollen und weiterhin kaum beleuchteten Thematik gewährleistet werden.

Beitrag zu Veröffentlichung II

Im Rahmen meiner Co-Autorenschaft bei der Publikation „Small-Animal PET Imaging of Tau Pathology with ^{18}F -THK5117 in 2 Transgenic Mouse Models.“ trug ich vor allem zur Akquirierung des Rohbilddatenmaterials der zum Baseline- und den verschiedenen Follow-Up-Zeitpunkten erfolgten Bildgebungen mit ^{18}F -THK5117 bei. Zunächst widmete ich mich jedoch der Literaturrecherche, deren Ergebnisse in die Konzeption der Studie miteinfließen. Was auch die Frage nach den optimalen Mausmodellen und den jeweiligen PET-Scan-Zeitpunkten voranbrachte. Zudem war ich in der Verarbeitung der Datensätze der ^{18}F -THK5117 PET-Bilder mit PMOD, in die SUVR-Berechnung, in die Durchführung der Partialvolumeneffektkorrektur, der Normalisierung und in die visuellen Qualitätskontrollen der prozessierten Bilddaten involviert. Des Weiteren erstellte und aktualisierte ich diverse Excel-Tabellen zur Veranschaulichung der bereits erhobenen und prozessierten Rohdaten. Ferner war ich unterstützend in die Durchführung der statistischen Datenanalysen sowie in die Erstellung von Diagrammen zur Visualisierung der Ergebnisse der Berechnungen involviert.

3. Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Promotionsarbeit widmete ich mich zweier Probleme bzw. Fragestellungen der präklinischen Bildgebung neurodegenerativer Erkrankungen:

Im ersten Teil soll die Möglichkeit des *in vivo* Monitorings des M. Alzheimer durch das Validieren der Neuroinflammations-Bildgebung mit Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erweitert und etabliert werden. Besonders zur Abschätzung und Evaluation potenzieller Therapieansätze der Alzheimer-Demenz kommt dem *in vivo* Monitoring hier eine hervorgehobene Bedeutung zu. Im Sinne eines synergistischen, diagnostischen Ansatzes wurden zur Detektion der pathologischen Korrelate im erkrankten Gehirn der Versuchstiere mehrere Tracer eingesetzt. ^{18}F -Fluordesoxyglucose und ^{18}F -Florbetaben (^{18}F -FBB) als Amyloid-Tracer sind bereits gut evaluiert und kamen in dieser Versuchsreihe systematisch zum Einsatz. ^{18}F -GE180 wurde hier mit dem Hintergrund eines Erkenntniszugewinns durch das Abbilden neuroinflammatorischer Prozesse genutzt. Zunächst wurden Gruppen von transgenen Mäusen und deren C57Bl/6 Kontrollgruppe im Alter von 5 bis 16 Monaten der Kleintier PET Bildgebung zugeführt. Diese sind nach intravenöser Injektion von ^{18}F -FBB und ^{18}F -FDG jeweils statisch, sowie mit ^{18}F -GE180 zunächst für 0-90min. p.i. dynamisch, im PET Siemens Inveon gemessen und ausgewertet worden. Nach standardisierter Normalisierung der Daten auf einen MRT Atlas des Mausgehirns wurden dreidimensionale Zielvolumina definiert. Anschließend wurden die Daten im Vergleich zu einer möglichst pathologiefreien Referenzregion analysiert. Hierfür wurde das Kleinhirn und dessen Weiße Substanz herangezogen, sodass die Standardaufnahmewerte von Ziel- und Referenzregion vergleichend gebildet werden konnten. Daraufhin wurden die erhobenen Daten mittels *ex vivo* Autoradiographie und Immunhistologischer Verfahren überprüft. Zunächst konnten wir für den TSPO-Tracer ^{18}F -GE180 ein statisches Analysefenster von 60 – 90 min. p.i. eruieren. Wobei sich, verglichen mit der dynamischen Analyse (0-90 Minuten p.i.), keine signifikanten Abweichungen nachweisen ließen. Bereits bei Betrachtung der Baseline Analyse mit ^{18}F -GE180 zeigten transgene Tiere zu ihren altersentsprechenden Kontrollgruppen einen Signalanstieg von +9% ($P < 0,005$). Dieser

steigerte sich bei Tieren im Alter von 16 Monaten deutlich auf +25% ($P < 0,001$). Im Hinblick auf ^{18}F -FBB erhöhte sich das kortikale Signal in dieser Altersgruppe um +24% ($P < 0,001$) zu dem altersentsprechender Wildtypen. Bei ^{18}F -FDG hingegen konnten wir in jedem Alter ein deutlich höheres Signal nachweisen, mit einem Maximum von +12% mit 8 Monaten, dessen Anstieg sich im Alter von 16 Monaten auf +5% abmilderte. Eine positive Korrelation der Signalverteilung und Signalstärke zeigt sich besonders zwischen ^{18}F -GE180 und ^{18}F -FDG ($R = 0,55$), jedoch nicht zwischen ^{18}F -Florbetaben und den zuvor genannten Tracern. Die longitudinale Signalprogression des PET-Signales von ^{18}F -GE180 ließ sich *in vitro* mittels immunhistochemischer IBA-1 Anfärbung bestätigen. Des Weiteren zeigte der Vergleich von ^{18}F -Florbetaben in der Methoxy-x04 Anfärbung für fibrillär angereichertes Amyloid eine exzellente Korrelation von $R = 0,80$; ($P < 0,001$). In den angefertigten Autoradiographien stimmen die typischen Verteilungsmuster der β -Amyloidanreicherung mit denen der *in vivo* erhobenen Daten überein.

Im zweiten Teil der Studie sollten die molekularen Bildgebungsmöglichkeiten im Hinblick auf die Tauopathien mit einem Tau-spezifischen Tracer erweitert werden. Dabei wurden zwei verschiedene Gruppen transgener Mäuse (P301S und biGT) longitudinal mittels PET untersucht. Diesen Tieren und deren entsprechender C57Bl/6 Kontrollgruppe wurde im Alter von 5 bis 22 Monaten der erst kürzlich etablierte Tau-Tracer ^{18}F -THK5117 über die Schwanzvene injiziert. Die Durchführung der Messung erfolgte jeweils über 90 Minuten dynamisch im Siemens Inveon Kleintier PET. Die Daten wurden anhand von Standardaufnahmewerten unter Zuhilfenahme des Cerebellums als Referenzregion und Zeitaktivitätskurven sowie standardisierter parametrischer Analyse ausgewertet. Für beide Gruppen wurden, nach SPM Analyse, jeweils zur Kohorte passende Ziel- und Referenzregionen definiert. Die definierten Zielvolumina beinhalteten sowohl den entorhinalen Anteil des Mausgehirns als auch den Hirnstamm. Die gewonnenen Bilddaten wurden abschließend mittels AT8 Immunanfärbung, *ex vivo* Autoradiographie und Blockierungsexperimenten validiert.

Für ^{18}F -THK5117 konnte ein äquivalentes statisches Fenster von 20 - 50 min. p.i. eruiert werden. Im longitudinalen Verlauf wiesen sowohl P301S-, als auch die biGT Tiere eine signifikante Signalprogression zur Baseline auf. Für die P301S Kohorte war eine Progression des Signals im Hirnstamm von +11% ($P < 0,001$) in 8 - 11 Monate alten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten, wohingegen jüngere P301S Tiere von den Wildtypen nicht zu unterscheiden waren. Diese Zunahme konnte ebenfalls in der biGT Kohorte beobachtet werden. Hier zeigte sich der Zuwachs im entorhinalen Hirn und der Amygdala im Alter von 12 Monaten mit + 14,9% ($P < 0,001$), sowie 21 Monaten mit +15,2% ($P < 0,01$) im Vergleich zu den altersangepassten Wildtypen. Anschließend wurden *ex vivo* Autoradiographien der jeweiligen Kohorten, AT-8 Anfärbung zur histologischen Untersuchung sowie Blockierungsexperimente zur Überprüfung der durch die Bilddaten erhobenen Ergebnisse durchgeführt. P301S Tiere präsentierten in der immunhistochemischen *in vitro* Validierung AT-8 positive Tauablagerungen des Hirnstamms, die mit den PET Daten im Bereich der VOI (Brainstem) hoch korrelierten. In der biGT Kohorte zeigten sich diese Übereinstimmungen der AT-8 positiven Tauablagerungen im Bereich des entorhinalen Gehirns.

Zusammenfassend lässt sich aus dem ersten Teil meiner Arbeit ableiten, dass die Kombination aus mehreren Tracern einen sinnvollen, synergistischen Ansatz darstellt, um umfassendere Einblicke und potenzielle Therapieansätze in neurodegenerativen Erkrankungen zu erlangen. Insbesondere das Hinzuziehen von ^{18}F -GE180 erlaubt ein tieferes Verständnis der Neuroinflammation in Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz.

Darüber hinaus konnte im zweiten Teil der Dissertation ^{18}F -THK5117 als effektiver Tracer für die *in vivo* Darstellung der Tauablagerung validiert werden, obgleich die intrazellulären Ablagerungen der NFT weiterhin Hürden in der Bildgebung darstellen. Das Mausmodell der biGT Kohorte erwies sich als potentes Studienmodell der Tauopathien, wohingegen P301S Tiere aufgrund ihrer bereits frühen Morbidität und Letalität für entsprechende Therapiestudien vergleichsweise unterlegen sind.

4. Summary

Within the scope of my doctoral thesis I dedicated myself to two problems or questions of preclinical imaging of neurodegenerative diseases:

In the first part, the possibility of *in vivo* monitoring of Alzheimer's disease by validating neuroinflammation imaging with positron emission tomography (PET) will be extended and established. *In vivo* monitoring is of particular importance for the assessment and evaluation of potential therapies for Alzheimer's dementia. In the sense of a synergistic, diagnostic approach, several tracers were used to detect the pathological correlates in the diseased brain of the experimental animals. ^{18}F Fluorodeoxyglucose and ^{18}F Florbetaben have already been well evaluated and were systematically used in this series of experiments. ^{18}F -GE180 was used here with the background of a gain in knowledge through the imaging of neuroinflammatory processes. First, groups of transgenic mice and their C57Bl/6 control group at the age of 5 to 16 months were exposed to small animal PET imaging. After intravenous injection of ^{18}F -FBB and ^{18}F -FDG, these were measured and evaluated in PET Siemens Inveon, both statically and dynamically with ^{18}F -GE180, initially for 0 - 90 min. p.i. After standardized normalization of the data to an MRI atlas of the mouse brain, three-dimensional target volumes were defined. Subsequently, the data were analysed in comparison to a reference region that was as pathology-free as possible. For this purpose, the cerebellum and its white matter were used, so that the standardized uptake values of target and reference region could be formed comparatively. Afterwards, the collected data were checked by *ex vivo* autoradiography and immunohistological staining. Initially, a static analysis window of 60 - 90 min. p.i. was determined for the TSPO tracer ^{18}F -GE180. Compared to the dynamic analysis (0 - 90 minutes p.i.), no significant deviations were found. Already when considering the baseline analysis with ^{18}F -GE180, transgenic animals showed a signal increase of +9% ($P < 0.005$) in comparison to their age-related control groups. In animals at the age of 16 months, this signal increased significantly to +25% ($P < 0.001$). With regard to ^{18}F -FBB, the cortical signal increased by +24% ($P < 0.001$) in this age group compared to age-

matched wild types. For ^{18}F -FDG, however, we found a significantly higher signal at all ages, with a maximum of +12% at 8 months, which increment decreased to +5% at 16 months. A positive correlation of signal distribution and signal strength is particularly evident between ^{18}F -GE180 and ^{18}F -FDG ($R = 0.55$), but not between ^{18}F -Florbetaben and the tracers mentioned above. The longitudinal signal progression of the PET signal of ^{18}F -GE180 was confirmed *in vitro* by immunohistochemical IBA-1 staining. Furthermore, the comparison of ^{18}F -Florbetaben in the methoxy-x04 stain for fibrillary enriched amyloid showed an excellent correlation of $R = 0.80$; ($P < 0.001$). In the autoradiographs prepared, the typical distribution patterns of β -amyloid enrichment correspond to those of the data collected *in vivo*.

In the second part of the study, the molecular imaging possibilities with regard to tauopathies were to be extended with a tau-specific tracer. Two different groups of transgenic mice (P301S and biGT) were examined longitudinally using PET. These animals and their corresponding C57Bl/6 control group were injected at the age of 5 to 22 months with the recently established tau tracer ^{18}F -THK5117 via the tail vein. The measurement was performed dynamically in Siemens Inveon Small Animal PET for 90 minutes. The data were evaluated using standardized uptake values using the cerebellum as reference region and time-activity curves as well as standardized parametric analysis. For both groups, after SPM analysis, appropriate target and reference regions were defined for each cohort. The defined target volumes included both the entorhinal portion of the mouse brain and the brain stem. The acquired image data were finally validated by AT8 immunostaining, *ex vivo* autoradiography and blocking experiments.

For ^{18}F -THK5117 an equivalent static window of 20 - 50 min. p.i. could be determined. In the longitudinal course, both P301S and biGT animals showed a significant signal progression to the baseline. For the P301S cohort a signal progression in the brainstem of +11% ($P < 0.001$) was observed in 8 - 11 months old animals compared to the control group, whereas younger P301S animals were indistinguishable from the wild type. This increase was also observed in the biGT cohort in the entorhinal brain and amygdala at 12 months of age with +14.9% ($P < 0.001$) and at 21 months of age

with +15.2% ($P < 0.01$) compared to the age-matched wild types. Subsequently, *ex vivo* autoradiography of the respective cohorts, AT-8 staining for histological examination and blocking experiments were performed to verify the results obtained from the image data. P301S animals showed AT-8 positive tau deposits in brain stem through immunohistochemical *in vitro* validation, which correlated highly with PET data in the VOI (brainstem) region. In the biGT cohort, these correlations of AT-8 positive tau depositions were shown in the area of the entorhinal brain.

In summary, the first part of my work suggests that the combination of several tracers is a useful, synergistic approach to gain more comprehensive insights and potential therapeutic approaches in neurodegenerative diseases. In particular, the addition of ^{18}F -GE180 allows a deeper understanding of neuroinflammation associated with Alzheimer's dementia.

Furthermore, in the second part of the thesis ^{18}F -THK5117 could be validated as an effective tracer for the *in vivo* imaging of tau deposition. Whereby the intracellular depositions of the NFT continue to represent hurdles in imaging. The mouse model of the biGT cohort proved to be a potent study model of tauopathies, whereas P301S animals are comparatively inferior for corresponding therapy studies due to their early morbidity and lethality.

5. Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid

Mouse Model: A Triple Tracer PET Study

Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model: A Triple-Tracer PET Study

Matthias Brendel^{1*}, Federico Probst^{1*}, Anna Jaworska², Felix Overhoff¹, Viktoria Korzhova², Nathalie L. Albert¹, Roswitha Beck¹, Simon Lindner¹, Franz-Josef Gildehaus¹, Karlheinz Baumann³, Peter Bartenstein^{1,4}, Gernot Kleinberger^{2,4,5}, Christian Haass^{2,4,5}, Jochen Herms^{2,4}, and Axel Rominger^{1,4}

¹Department of Nuclear Medicine, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany; ²DZNE–German Center for Neurodegenerative Diseases, Munich, Germany; ³Roche Pharma Research and Early Development, Neuroscience Discovery, Roche Innovation Center Basel, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland; ⁴SyNergy, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany; and ⁵Biomedical Center (BMC), Ludwig-Maximilians-University of Munich, Munich, Germany

Amyloid imaging by small-animal PET in models of Alzheimer disease (AD) offers the possibility to track amyloidogenesis and brain energy metabolism. Because microglial activation is thought to contribute to AD pathology, we undertook a triple-tracer small-animal PET study to assess microglial activation and glucose metabolism in association with amyloid plaque load in a transgenic AD mouse model. **Methods:** Groups of PS2APP and C57BL/6 wild-type mice of various ages were examined by small-animal PET. We acquired 90-min dynamic emission data with ¹⁸F-GE180 for imaging activated microglia (18-kD translocator protein ligand [TSPO]) and static 30- to 60-min recordings with ¹⁸F-FDG for energy metabolism and ¹⁸F-florbetaben for amyloidosis. Optimal fusion of PET data was obtained through automatic nonlinear spatial normalization, and SUVRs were calculated. For the novel TSPO tracer ¹⁸F-GE180, we then calculated distribution volume ratios after establishing a suitable reference region. Immunohistochemical analyses with TSPO antisera, methoxy-X04 staining for fibrillary β -amyloid, and ex vivo autoradiography served as terminal gold standard assessments. **Results:** SUVR at 60–90 min after injection gave robust quantitation of ¹⁸F-GE180, which correlated well with distribution volume ratios calculated from the entire recording and using a white matter reference region. Relative to age-matched wild-type, ¹⁸F-GE180 SUVR was slightly elevated in PS2APP mice at 5 mo (+9%; $P < 0.01$) and distinctly increased at 16 mo (+25%; $P < 0.001$). Over this age range, there was a high positive correlation between small-animal PET findings of microglial activation with amyloid load ($R = 0.85$; $P < 0.001$) and likewise with metabolism ($R = 0.61$; $P < 0.005$). Immunohistochemical and autoradiographic findings confirmed the in vivo small-animal PET data. **Conclusion:** In this first triple-tracer small-animal PET in a well-established AD mouse model, we found evidence for age-dependent microglial activation. This activation, correlating positively with the amyloid load, implies a relationship between amyloidosis and inflammation in the PS2APP AD mouse model.

Key Words: neuroinflammation; TSPO; small animal PET; ¹⁸F-GE180; Alzheimer's disease

J Nucl Med 2016; 57:954–960
DOI: 10.2967/jnumed.115.167858

Alzheimer disease (AD) is the most common cause of dementia, and with its exponentially increasing incidence as a function of age among the elderly, it is imposing an ever more onerous burden on health care (1). This state of affairs motivates a worldwide effort to find new biomarkers predicting future cognitive decline in patients with suspected early AD and likewise for use as outcome measures in clinical trials of innovative disease-modifying agents (2). Immunologically mediated neuroinflammation is implicated in the pathophysiologic processes of AD (3,4), which are classically characterized by accumulation of extracellular β -amyloid plaques and intracellular neurofibrillary tangles (5). Many aspects of the classic β -amyloid pathology are emulated in various transgenic rodent models for AD (6,7), and translational studies of these processes are facilitated by small-animal PET using radioligands for imaging of AD biomarkers in these rodent models (8). In particular, small-animal PET imaging of β -amyloid has been successfully established in the past few years (9,10). However, information regarding neuroinflammation in these models remains sparse and rather inconsistent (11–13).

Neuroinflammation can be assessed by molecular imaging with several ¹¹C-labeled radiotracers targeting the 18-kD translocator protein (TSPO), which is highly expressed at the outer mitochondrial membrane of activated microglia (8,14); the brief physical half-life of ¹¹C presents logistic difficulties for its widespread use. However, novel ¹⁸F-fluorinated second-generation TSPO radiotracers now offer a more practical means to undertake imaging also at sites lacking a cyclotron/radiochemistry facility. Among the various such compounds, ¹⁸F-GE180 has emerged as a TSPO ligand affording excellent signal-to-noise ratio and brain kinetics favorable for the detection of microglial activation (15,16). However, monitoring of neuroinflammation in AD mice by this agent remains to be established.

The aim of this study was to investigate the novel TSPO tracer ¹⁸F-GE180 in PS2APP mice, a well-established transgenic AD mouse model; we have previously characterized by ¹⁸F-florbetaben

Received Oct. 6, 2015; revision accepted Feb. 2, 2016.
For correspondence or reprints contact: Axel Rominger, Department of Nuclear Medicine, University of Munich, Marchioninistrasse 15, 81377 Munich, Germany.
E-mail: axel.rominger@med.uni-muenchen.de
*Contributed equally to this work.
Published online Feb. 18, 2016.
COPYRIGHT © 2016 by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

small-animal PET the progressive amyloid plaque formation with aging in this strain (17). Thus, we performed ^{18}F -GE180 small-animal PET examinations in groups of transgenic (TG) and wild-type (WT) mice at various ages and also measured β -amyloid using ^{18}F -florbetaben and glucose metabolism using ^{18}F -FDG. With this multitracers approach we undertook to chart the interrelations of all 3 biomarkers in vivo during the life course of PS2APP mice to test the hypothesis of a potential coherence between neuroinflammation and amyloidosis. In particular, we anticipated that amyloidosis in TG PS2APP mice should result in greater inflammation, bringing in turn increased glucose metabolism. We confirmed the ^{18}F -GE180 small-animal PET results relative to gold standard findings obtained by immunohistochemistry and additionally by autoradiography ex vivo in a subset of animals.

MATERIALS AND METHODS

Radiochemistry

^{18}F -GE180. Radiosynthesis of ^{18}F -GE180 was performed as previously described (16), with slight modifications as presented in the supplemental materials (available at <http://jnm.snmjournals.org>). This procedure yielded a radiochemical purity exceeding 98% and a specific activity of $1,400 \pm 500$ GBq/ μmol at the end of synthesis.

^{18}F -Florbetaben and ^{18}F -FDG. Radiosynthesis of ^{18}F -florbetaben was performed as previously described (10). This procedure yielded a radiochemical purity exceeding 98% and a specific activity of 80 ± 20 GBq/ μmol at the end of synthesis. ^{18}F -FDG was purchased commercially.

Animals

All experiments were performed in compliance with the National Guidelines for Animal Protection, Germany, and the approval of the regional animal care committee (Regierung Oberbayern), and were overseen by a veterinarian. Animals were housed in a temperature- and humidity-controlled environment with a 12-h light–dark cycle, with free access to food (Sniff) and water.

The transgenic B6.PS2APP (line B6.152H) is homozygous for the human presenilin (PS) 2, N141I mutation and also the human amyloid precursor protein (APP) K670N, M671 L mutation. The APP and PS2 transgenes are driven by mouse Thy-1 and mouse prion promoters,

respectively. This line had been created by coinjection of both transgenes into C57BL/6 zygotes (18). Homozygous B6.PS2APP (PS2APP) mice show first appearance of plaques in the cortex and hippocampus at 5–6 mo of age (19).

Study Overview

The study design consisted of a pilot study and the main study.

In the pilot study, autoradiography ex vivo and in vitro was performed with ^{18}F -GE180, followed by immunohistochemistry in small groups of WT and TG mice at 10 and 22 mo of age.

In the main study, small-animal PET scans were obtained with the 3 radiopharmaceuticals described in groups of WT and TG mice aged 5, 8, 13, and 16 mo (± 0.5 mo). Within 1 wk after completion of the PET session, mice were perfused with phosphate-buffered saline while deeply anesthetized before immunohistochemical analyses. A detailed overview for the main study of the different groups of mice is provided in Table 1. To investigate reproducibility of results with ^{18}F -GE180, we undertook test–retest PET scans in a subset of 11 TG animals (age, 5–16 mo; $n = 2$ –3 at each time point) at an interval of 1 wk to allow recovery from anesthesia.

Small-Animal PET Data Acquisition, Reconstruction, and Coregistration

Details of the acquisition protocol and reconstruction algorithms as well as coregistration procedures are provided in the Supplemental Methods.

Small-Animal PET Data Analyses

Volumes of interest (VOIs) were defined on the MRI mouse atlas (Fig. 1). A large forebrain target VOI (comprising 156 mm³), containing most of the frontal and parietal cortex as well as the hippocampus and the thalamus, was used for all tracers. For reference region analysis in the case of ^{18}F -GE180 small-animal PET, we tested several different tissue compartments. The reference regions consisted of a whole-brain VOI (comprising 525 mm³) and a whole cerebellar VOI (comprising 65 mm³) as described previously (20). We also tested oval-shaped white matter VOIs mostly containing white matter tissue of the cerebellum and the brain stem (comprising 29 mm³), which emerged by voxelwise mapping of the contrast between WT and TG and WT groups, as described in detail in the Supplemental Methods and illustrated in Supplemental Figure 1.

TABLE 1
Overview for Main Study

Mouse model	Age (mo)	^{18}F -GE180 small-animal PET (n)	^{18}F -GE180 small-animal PET (SUV _{FBR/WM})	^{18}F -florbetaben small-animal PET (n)	^{18}F -florbetaben small-animal PET (SUV _{FBR/WM})	^{18}F -FDG small-animal PET (n)	^{18}F -FDG small-animal PET (SUV _{FBR/CBL})
PS2APP	5	6	$0.69 \pm 0.03^{\dagger}$	6	0.80 ± 0.02	6	$0.85 \pm 0.05^{\ddagger}$
	8	5	$0.72 \pm 0.02^{\ddagger}$	4	0.82 ± 0.03	4	$0.90 \pm 0.05^{\ddagger}$
	13	8	$0.81 \pm 0.03^{\ddagger}$	8	$0.90 \pm 0.02^{\ddagger}$	8	$0.94 \pm 0.02^{\ddagger}$
	16	8	$0.83 \pm 0.04^{\ddagger}$	7	$0.96 \pm 0.03^{\ddagger}$	7	$0.91 \pm 0.03^*$
C57BL/6	5	8	0.63 ± 0.01	8	0.79 ± 0.01	8	0.77 ± 0.03
	8	8	0.65 ± 0.03	8	0.79 ± 0.01	8	0.80 ± 0.03
	13	8	0.66 ± 0.02	8	0.78 ± 0.02	8	$0.86 \pm 0.04^{\ddagger}$
	16	8	$0.67 \pm 0.02^*$	8	0.78 ± 0.02	8	$0.86 \pm 0.04^{\ddagger}$

Groups of PS2APP and C57BL/6 mice are provided together with forebrain small-animal PET SUVs for the 3 radiotracers. Significant differences in PS2APP mice versus age-matched C57BL/6 control or significant differences in C57BL/6 controls against their 5-mo-old littermates are marked by * $P < 0.05$; $^{\dagger}P < 0.01$; $^{\ddagger}P < 0.001$; 1-way ANOVA.

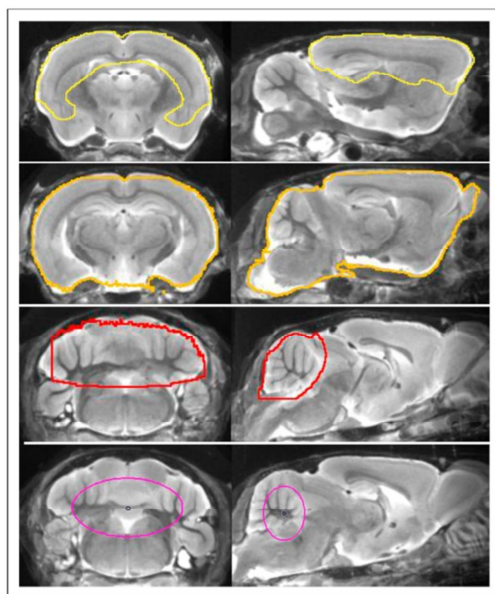


FIGURE 1. Definitions of forebrain (yellow), whole brain (orange), cerebellar (red), and white matter (purple) volumes of interest projected on mouse brain MRI atlas in coronal and sagittal slices.

On the basis of our previous experience, the entire cerebellum was used for scaling of ^{18}F -FDG data. For ^{18}F -florbetaben, a different white matter reference region (67 mm³; pons, midbrain, hindbrain parts of the subcortical white matter) emerged superior to scaling by the cerebellum (21), such that we switched the amyloid PET analysis to this reference region. In animals receiving the full dynamic ^{18}F -GE180 small-animal PET scan, distribution volume ratio maps were calculated using a linear graphic method (22), relative to a white matter VOI intended to serve as a pathology-free reference tissue. We extracted and compared time-activity curves of the several target and reference VOIs.

SUVs for target and reference VOIs were calculated by scaling to the injected dose and multiplying the body weight for ^{18}F -GE180. Forebrain target-to-reference tissue SUVRs were used for calculation of $\text{SUVR}_{\text{FBR/REF}}$ for the case of dynamic ^{18}F -GE180 scans and for the static frames for the cases of all of ^{18}F -florbetaben and ^{18}F -FDG.

Ex Vivo and In Vitro Autoradiography

In the pilot study, autoradiography experiments were performed to confirm the specificity of ^{18}F -GE180 small-animal PET results to TSPO distribution. Autoradiography ex vivo was performed in 2 TG mice aged 22 mo at 60 min after injection of 9.2 MBq of ^{18}F -GE180 (+150 μL saline). In vitro autoradiography with ^{18}F -GE180 at a range of concentrations (with and without blocking by TSPO antibody) and ^{18}F -florbetaben was performed in brain cryostat sections from the pilot study subset of aged TG mice. Details of the autoradiography procedures are provided in the Supplemental Methods.

Immunohistochemistry: Acquisition and Image Analysis

Plaque and microglial load were calculated as the summed area of all labeled plaques and microglia and reported as percentage densities relative

to the entire cerebral cortex areas. These analyses were performed by an operator who was masked to the small-animal PET results. Methodologic details can be found in the Supplemental Methods.

Statistics

Group comparisons of VOI-based small-animal PET results between WT and TG mouse groups were assessed by 1-way ANOVA and Tukey post hoc test for multiple comparisons using IBM SPSS Statistics (version 22.0; SPSS). For correlation analyses, Pearson coefficients of correlation (R) were calculated. A threshold of P less than 0.05 was considered to be significant for rejection of the null hypothesis.

RESULTS

Validation of ^{18}F -GE180 PET

VOI-based analyses were performed with the dynamic dataset to establish the kinetics of ^{18}F -GE180 in target tissues of WT and TG animals and to define optimal time windows and reference tissue normalization for routine small-animal PET examinations.

Time-activity curves for ^{18}F -GE180 in several reference tissues, calculated as SUV (mean \pm SD) in TG mice at different ages, are shown in Figure 2A. Age dependence of the time-activity curves is conspicuous with whole brain and whole cerebellar scaling, whereas the white matter reference tissue yielded a distinctly higher congruence between animal groups. Mean white matter reference SUV in the interval 60–90 min after injection was similar in TG and WT of all ages (range of SUV_{mean} , 2.98–3.16; range of SUV SD, 0.44–0.58; no significant intergroup differences).

No relevant spill-in of extracerebral activity to the brain was observed during the entire 90-min emission sequences. The reference tissue ratio time-activity curves revealed an equilibrium binding in brain occurring by 20 min for the aged TG groups (13 and 16 mo), whereas younger TG groups (5 and 8 mo) indicated a slight but constant decline in cerebral activity, with a trend toward apparent equilibrium in the last 2 frames. Thus, as an alternative to kinetic modeling for ^{18}F -GE180 quantification, the use of SUVR in a static frame recorded in the interval 60–90 min after injection provides a convenient surrogate marker for specific binding (Fig. 2B).

In this regard, there was excellent linear relationship between distribution volume ratio, calculated for the entire 90-min recording, and the 60- to 90-min static frame SUVR ($R = 0.99$, $P < 0.001$) (Fig. 2C). Test-retest analyses confirmed as well the robustness of 60- to 90-min $\text{SUVR}_{\text{FBR/WM}}$ for the forebrain target region in TG animals (best fit: $R = 0.98$, linear, $P < 0.001$; test-retest variability: 1.9%).

Variance in the forebrain ^{18}F -GE180 SUVR for the 60- to 90-min static recording within groups of mice was distinctly lower in conjunction with a white matter reference region (mean SD, 4.5% \pm 1.0%; range, 3.0%–5.9%) than the plain SUV (mean SD, 15.7% \pm 4.7%; range, 8.8%–21.2%; Fig. 2D).

Triple-Tracer Small-Animal PET Analyses

All small-animal PET results are provided in Table 1. TG mice already showed elevated $\text{SUVR}_{\text{FBR/WM}}$ ^{18}F -GE180 uptake when compared with age-matched WT mice as early as 5 mo (+9%; $P < 0.005$), which increased substantially by 16 mo (+25%; $P < 0.001$) (Fig. 3). ^{18}F -florbetaben $\text{SUVR}_{\text{FBR/WM}}$ in TG mice was near the WT level at 5 and 8 mo (+2%, +4%; $P = \text{not significant}$) and increased at 13 mo (+15%; $P < 0.001$) and 16 mo (+24%; $P < 0.001$) to age-matched WT mice. ^{18}F -FDG $\text{SUVR}_{\text{FBR/CBL}}$

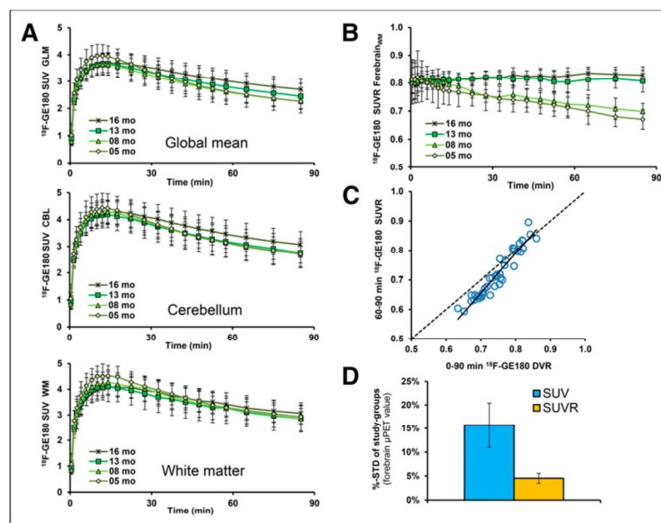


FIGURE 2. (A) Mean ^{18}F -GE180 uptake reported as SUV for each of 3 reference regions as function of time after tracer administration in groups of PS2APP mice. Least evidence of pathology (i.e., stability between TG and WT) was detected for a white matter pseudo reference region. Error bars indicate SD for estimates in groups of 5–8 animals. (B) Target-to-reference ratios as functions of time after ^{18}F -GE180 administration in groups of PS2APP mice. (C) Correlation of ^{18}F -GE180 distribution volume ratio (DVR) calculated from 90-min dynamic small-animal PET recordings with corresponding SUVr (forebrain/white-matter) results from 60- to 90-min static frame. Dotted line represents a perfect line of identity ($\text{DVR} = \text{SUVr}$). (D) Stability of forebrain ^{18}F -GE180 values after SUV calculation (blue) and pseudo reference tissue (orange) scaling as expressed by mean $\% \pm \text{SD}$ ($\pm \text{SD}$) in all 8 groups of TG and WT mice.

was significantly higher in PS2APP TG mice at all ages than in age-matched WT groups, with the peak increase at 8 mo ($+12\%$; $P < 0.001$), which subsequently declined in the 16-mo group ($+5\%$; $P < 0.05$).

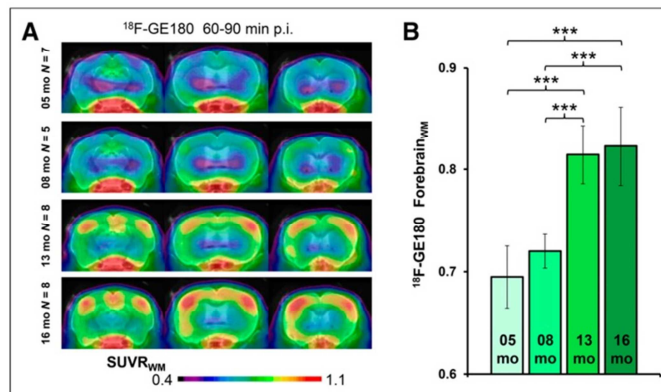


FIGURE 3. (A) Coronal planes of ^{18}F -GE180 mean SUVR maps at different ages of PS2APP animals projected on an MRI mouse atlas (gray scale). (B) Mean ($\pm \text{SD}$) SUVR estimates for PS2APP animals at different ages. Significant differences between subgroups are marked by *** $P < 0.001$; 1-way ANOVA. p.i. = after injection.

There was an excellent positive correlation ($R = 0.85$; $P < 0.001$) between ^{18}F -GE180 $\text{SUVr}_{\text{FBR/WM}}$ and ^{18}F -florbetaben $\text{SUVr}_{\text{FBR/WM}}$ in the pooled PS2APP TG mice. Lesser correlations were seen between ^{18}F -FDG $\text{SUVr}_{\text{FBR/CBL}}$ and ^{18}F -GE180 $\text{SUVr}_{\text{FBR/WM}}$ ($R = 0.61$; $P < 0.005$) as well as between ^{18}F -FDG $\text{SUVr}_{\text{FBR/CBL}}$ and ^{18}F -florbetaben $\text{SUVr}_{\text{FBR/WM}}$ ($R = 0.48$; $P < 0.01$) (Fig. 4). WT indicated a high positive correlation between ^{18}F -FDG $\text{SUVr}_{\text{FBR/CBL}}$ and ^{18}F -GE180 $\text{SUVr}_{\text{FBR/WM}}$ ($R = 0.55$; $P < 0.005$). No significant associations between ^{18}F -FDG $\text{SUVr}_{\text{FBR/CBL}}$ or ^{18}F -GE180 $\text{SUVr}_{\text{FBR/WM}}$ with ^{18}F -florbetaben $\text{SUVr}_{\text{FBR/WM}}$ were observed. The age dependence in the uptake of the 3 tracers is presented in Figure 5.

Autoradiography and Immunohistochemistry

IBA-1 antibody in vitro quantitation (occupancy [%]) in the whole group of PS2APP mice showed a strong positive correlation with the ^{18}F -GE180 uptake in vivo ($R = 0.61$; $P < 0.005$). ^{18}F -florbetaben uptake and percentage plaque load (%) as assessed by methoxy-X04 histology had a high correlation finding ($R = 0.80$; $P < 0.001$), as in our previous β -amyloid-PET studies (10,17). Both immunohistochemical staining methods indicated a progression of pathophysiology with age in a manner congruent with the PET data (Supplemental Fig. 2).

The pattern of ^{18}F -GE180 binding seen by autoradiography ex vivo resembled the binding observed in the small-animal PET scan, and triple labeling in vitro showed colocalization of TSPO activation with fibrillar β -amyloid deposits (Fig. 6). Qualitatively, the ^{18}F -GE180 autoradiography in vitro was more diffuse than for ^{18}F -florbetaben, which showed a more focal pattern. Prior incubation of brain sections with TSPO antibody completely blocked ^{18}F -GE180 labeling in the forebrain, thus indicating the specific association of increased TSPO expression and amyloid plaques (Supplemental Fig. 3).

DISCUSSION

We present the first, to our knowledge, small-animal PET study with 3 different ^{18}F -labeled radiotracers targeting distinct aspects of the pathophysiology in a transgenic mouse model of AD—that is, microglial activation, amyloid deposition, and brain energy metabolism. The novel TSPO ligand ^{18}F -GE180 enabled a robust detection of activated microglia in the TG mouse brain, yielding results concurring closely with immunohistochemical findings

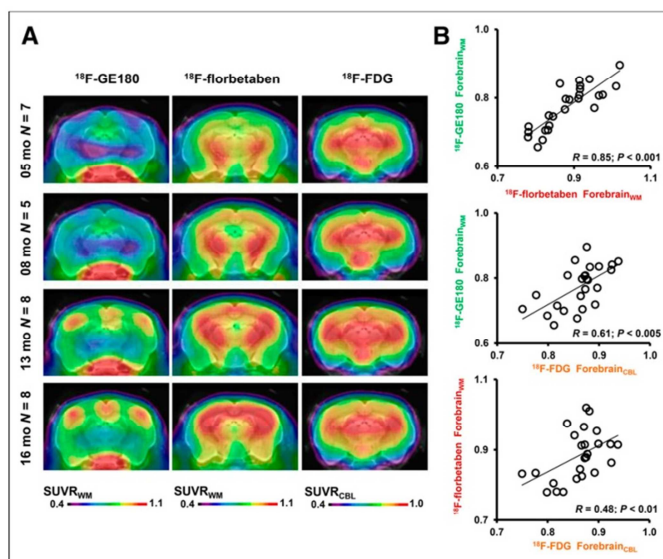


FIGURE 4. (A) Coronal planes of mean SUVR maps for all 3 different radiotracers at different ages of PS2APP animals, projected on an MRI mouse atlas (gray scale). (B) Correlations between the different forebrain radiotracer SUVR for all PS2APP mice.

and autoradiography in vitro. The consensus of our results clearly indicates coexistence of amyloidosis and neuroinflammation in PS2APP TG mice, together increasing in parallel with increasing age. These findings are seemingly accompanied by elevated glucose consumption.

^{18}F -GE180 Reference Region

One key issue in detecting microglial activation by PET is the lack of an appropriate pathology-free reference tissue—that is, a region devoid of TSPO expression in the mouse brain (23). In the absence of a true reference region, a recent PET study of TSPO expression in AD patients showed clear benefits for an SUVR analysis with the

cerebellum as a pseudoreference region, compared with quantitation relative to arterial blood input for ^{11}C -PBR28 (24). Therefore, we tested several reference tissues for our novel ligand for TSPO, ^{18}F -GE180. Our analyses revealed that a reference region composed of white matter voxels in the brain stem and cerebellum delivered comparable SUV results between TG and WT groups at different ages. In contrast, the whole brain and, to a lesser degree, the cerebellum showed elevated SUV in TG mice with marked pathology, thus being less suitable as a reference region. The white matter reference VOI was of a size (29 mm³) sufficient to minimize signal loss due to partial-volume effects (25). Furthermore, the SUVR approach distinctly minimized the intragroup variance in TSPO results compared with that with simple SUV calculation, which is in line with findings from the human study cited above (24). Thus, we see a clear advantage for a cerebral pseudoreference region in the semiquantitative analysis of preclinical TSPO imaging.

^{18}F -GE180 Time Window

^{18}F -GE180 small-animal PET showed uptake throughout the mouse brain and only minor uptake in extracerebral regions such as cranium or Harderian glands relative to the brain. Ratio analysis of the measured time-activity curves revealed attainment of stable values in aged TG animals as early as 20 min after injection, whereas ratio time-activity curves in younger TG animals tended to have a more delayed stabilization in late-acquisition frames after 50 min, favoring the use of a late static window in routine acquisitions. The distribution volume ratio results using the entire 90-min recordings had an excellent correlation with the SUVR in the 60- to 90-min static frame, which further supports the use of this time window for economic small-animal PET imaging in large study groups.

Neuroinflammation in TG Mouse Model of AD

Age-dependent increases in TSPO expression emerged as a clear surrogate for neuroinflammation in PS2APP mice and clearly reveal a temporal association with the amyloid cascade. Our findings of 25% elevated SUVR_{WM} for ^{18}F -GE180 in aged TG mice compared with WT mice indicates a satisfactory signal-to-noise ratio for ^{18}F -GE180, whereas in vivo findings matched closely with TSPO immunohistochemistry in vitro. A recent study with the same radiotracer in another AD mouse model (APP/PS1dE9) found similar age-dependent microglial activation in the cortex and hippocampus matching with terminal immunohistochemistry findings (26). Present findings are also in line with a recent report of elevated neuroinflammation in the brains of aged APPswePS1-dE9 mice as examined by ^{18}F -DPA-714 small-animal PET (13) as was also confirmed in autoradiographic and immunohistochemical analyses. Our results show a close correlation between accumulation of amyloid load and TSPO expression in PS2APP mice, about which the causal relationship is still under debate (3), and we speculate about this issue in the

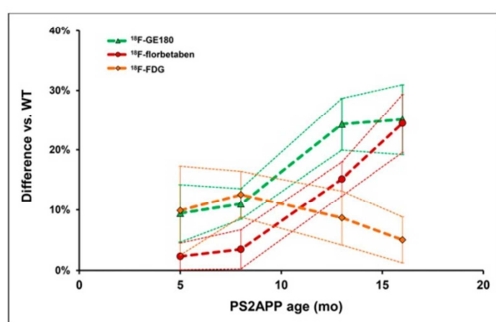


FIGURE 5. Life-course kinetics for PS2APP mice as expressed by % difference (±SD) versus C57BL/6 controls for the 3 different radiotracers.

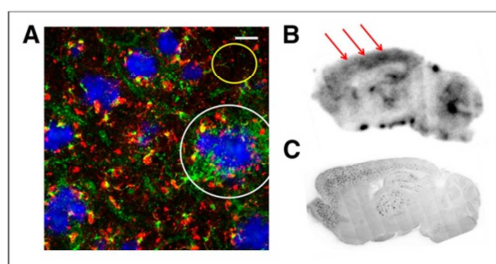


FIGURE 6. (A) Immunohistochemical costaining shows IBA-1- (red) and TSPO- (green) positive cells adjacent (white circle) to fibrillar amyloid plaques (blue) in the frontal cortex of a PS2APP mouse aged 22 mo. Yellow circle indicates low IBA-1 and TSPO staining between amyloid plaques. Scale bar represents 20 μ m. (B) Sagittal plane for 18 F-GE180 autoradiography ex vivo (60 min after injection) in a 22-month-old PS2APP mouse indicates extensive radiotracer uptake in neocortex (red arrows), hippocampus, and thalamus, which is colocalized with fibrillar amyloid as detected in corresponding methoxy-X04 staining in these brain regions (C). No specific binding is observed in cerebellum.

Supplemental Discussion. Remarkably, our PS2APP mice do not indicate a relevant neurodegeneration at 16 mo of age (18), even though they show severe neuroinflammation and amyloid pathology. Furthermore, normalized 18 F-FDG uptake, a small-animal PET marker for glucose metabolism, was elevated in PS2APP mice, especially in the young group and to a lesser extent still at 16 mo of age, compared with findings in WT groups. This seems in line with previous reports of elevated relative glucose metabolism in amyloid models, such as APP/PS1 (27) and 5xFAD (28) mice, in which glial activation was discussed as a probable factor. However, this interpretation seems at odds with 18 F-FDG findings in human AD and in prodromal patients with amnesic mild cognitive impairment (29). Nonetheless there is even evidence about metabolic compensation in AD (30), in which the synaptic dysfunction might mask inflammation-related hypermetabolism.

In Vivo Therapy Monitoring

In our hands, microglial activation and amyloid levels as assessed by small-animal PET had high interanimal variability as has been reported for other AD mouse models (7). Therefore, the sensitivity of terminal assessments of treatment effects on neuroinflammation or amyloidogenesis would likely be hampered by this variance. This circumstance emphasizes the value of a reliable noninvasive treatment monitoring, which offers the possibility to account for baseline pathology levels at therapy initiation, and also allows the detection of longitudinal changes in individual mice, as shown in our recent anti-amyloid treatment small-animal PET study (31). Neuroinflammation constitutes an interesting therapy target in its own right, and present results with 18 F-GE180 small-animal PET show considerable promise for this application.

Limitations

This was a cross-sectional study in groups of mice from the same breeding program; a true longitudinal setting would have entailed serial small-animal PET examinations for each biomarker in each mouse. This would have required 12 small-animal PET scans per mouse, likely resulting in an increased incidence of dropouts and without the possibility of performing immunohistochemical validation

in each mouse for all ages. Additionally, we feel that this limitation is balanced by the adequately powered sample sizes, which yielded results sufficiently robust to detect significant differences even between mouse groups at 5 mo of age.

CONCLUSION

In vivo imaging of neuroinflammation by small-animal PET with the novel TSPO ligand 18 F-GE180 is feasible, and results correlate strongly with immunohistochemical gold standard assessment, with further support by autoradiographic findings ex vivo. Single-frame recordings at 60–90 min after injection yield robust and reproducible SUVRs that shall bring considerable economy to small-animal PET studies with large group size. In PS2APP mice, age-dependent amyloid accumulation, revealed by 18 F-florbetaben, occurs in conjunction with inflammation as assessed by 18 F-GE180 small-animal PET. Glucose metabolism as assessed by 18 F-FDG small-animal PET correlated positively with inflammation, but hypermetabolism relative to WT mice was pronounced in young TG mice, illustrating a concomitant inflammatory process in association with the amyloidosis in this transgenic AD mouse model.

DISCLOSURE

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734. The study was financially supported by the Synergy Cluster and by the “Verein zur Förderung von Wissenschaft und Forschung,” LMU Munich. No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGMENTS

A part of this paper originated from the doctoral thesis of Federico Probst. We thank Karin Bormann-Giglmair and Rosel Oos for excellent technical assistance. Florbetaben precursor was provided by Piramal Imaging. GE180 cassettes were received from GE. We acknowledge textual revisions by Inglewood Biomedical Editing.

REFERENCES

1. Ziegler-Graham K, Brookmeyer R, Johnson E, Arrighi HM. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. *Alzheimers Dement*. 2008;4:316–323.
2. Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, et al. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement*. 2012;8:S1–S68.
3. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14:388–405.
4. McGeer PL, McGeer EG. Mechanisms of cell death in Alzheimer disease: immunopathology. *J Neural Transm Suppl*. 1998;54:159–166.
5. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009;118:5–36.
6. Hall AM, Roberson ED. Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2012;88:3–12.
7. Teipel SJ, Buchert R, Thome J, Hampel H, Palanke J. Development of Alzheimer-disease neuroimaging-biomarkers using mouse models with amyloid-precursor protein-transgene expression. *Prog Neurobiol*. 2011;95:547–556.
8. Zimmer ER, Parent MJ, Cuervo AC, Gauthier S, Rosa-Neto P. MicroPET imaging and transgenic models: a blueprint for Alzheimer's disease clinical research. *Trends Neurosci*. 2014;37:629–641.
9. Manook A, Yousefi BH, Willuweit A, et al. Small-animal PET imaging of amyloid-beta plaques with [11 C]PIB and its multi-modal validation in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7:e31310.

10. Rominger A, Brendel M, Burgold S, et al. Longitudinal assessment of cerebral beta-amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant beta-amyloid precursor protein using ^{18}F -florbetaben PET. *J Nucl Med*. 2013;54:1127–1134.
11. Rapic S, Backes H, Viel T, et al. Imaging microglial activation and glucose consumption in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34:351–354.
12. Rodriguez-Vieitez E, Ni R, Gulyas B, et al. Astrocytosis precedes amyloid plaque deposition in Alzheimer APPsw transgenic mouse brain: a correlative positron emission tomography and in vitro imaging study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42:1119–1132.
13. Sérière S, Tauber C, Vercouillie J, et al. Amyloid load and translocator protein 18 kDa in APPswPS1-dE9 mice: a longitudinal study. *Neurobiol Aging*. 2015;36:1639–1652.
14. Cumming P, Pedersen MD, Minuzzi L, et al. Distribution of PK11195 binding sites in porcine brain studied by autoradiography in vitro and by positron emission tomography. *Synapse*. 2006;59:418–426.
15. Dickens AM, Vainio S, Marjamäki P, et al. Detection of microglial activation in an acute model of neuroinflammation using PET and radiotracers ^{11}C -(R)-PK11195 and ^{18}F -GE-180. *J Nucl Med*. 2014;55:466–472.
16. Wickström T, Clarke A, Gausemei I, et al. The development of an automated and GMP compliant FASTlab synthesis of ^{18}F [GE-180; a radiotracer for imaging translocator protein (TSPO). *J Labelled Comp Radiopharm*. 2014;57:42–48.
17. Brendel M, Jaworska A, Griessinger E, et al. Cross-sectional comparison of small animal ^{18}F -florbetaben amyloid-PET between transgenic AD mouse models. *PLoS One*. 2015;10:e0116678.
18. Richards JG, Higgins GA, Ouagazzal AM, et al. PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPsw, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. *J Neurosci*. 2003;23:8989–9003.
19. Ozmen L, Albientz A, Czech C, Jacobsen H. Expression of transgenic APP mRNA is the key determinant for beta-amyloid deposition in PS2APP transgenic mice. *Neurodegener Dis*. 2009;6:29–36.
20. Brendel M, Delker A, Rotzer C, et al. Impact of partial volume effect correction on cerebral beta-amyloid imaging in APP-Swe mice using ^{18}F -florbetaben PET. *Neuroimage*. 2014;84:843–853.
21. Overhoff F, Brendel M, Jaworska A, et al. Automated spatial brain normalization and hindbrain white matter reference tissue give improved ^{18}F -florbetaben PET quantitation in Alzheimer's model mice. *Front Neurosci*. 2016;10:45.
22. Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Ding YS, Alexoff DL. Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:834–840.
23. Pedersen MD, Minuzzi L, Wrenfeldt M, et al. Up-regulation of PK11195 binding in areas of axonal degeneration coincides with early microglial activation in mouse brain. *Eur J Neurosci*. 2006;24:991–1000.
24. Lyoo CH, Ikawa M, Liow JS, et al. Cerebellum can serve as a pseudo-reference region in Alzheimer disease to detect neuroinflammation measured with PET radioligand binding to translocator protein. *J Nucl Med*. 2015;56:701–706.
25. Constantinescu CC, Mukherjee J. Performance evaluation of an Inveon PET preclinical scanner. *Phys Med Biol*. 2009;54:2885–2899.
26. Liu B, Le KX, Park MA, et al. In vivo detection of age- and disease-related increases in neuroinflammation by ^{18}F -GE180 TSPO microPET imaging in wild-type and Alzheimer's transgenic mice. *J Neurosci*. 2015;35:15716–15730.
27. Poinsin G, Herard AS, El Tannir El Tayara N, et al. Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2012;33:1995–2005.
28. Rojas S, Herance JR, Gispert JD, et al. In vivo evaluation of amyloid deposition and brain glucose metabolism of 5XFAD mice using positron emission tomography. *Neurobiol Aging*. 2013;34:1790–1798.
29. Ewers M, Brendel M, Rizk-Jackson A, et al. Reduced FDG-PET brain metabolism and executive function predict clinical progression in elderly healthy subjects. *Neuroimage Clin*. 2014;4:45–52.
30. Caroli A, Lorenzi M, Geroldi C, et al. Metabolic compensation and depression in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2010;29:37–45.
31. Brendel M, Jaworska A, Herms J, et al. Amyloid-PET predicts inhibition of de novo plaque formation upon chronic gamma-secretase modulator treatment. *Mol Psychiatry*. 2015;20:1179–1187.

6. Small-Animal PET Imaging of Tau Pathology with ¹⁸F-THK5117 in 2

Transgenic Mouse Models

materials (available at <http://jnm.snmjournals.org>), yielding a radiochemical purity of greater than 98% and specific activity of 202 ± 56 GBq/ μ mol at the end of synthesis.

Animals

All experiments were performed in compliance with the National Guidelines for Animal Protection (Germany) and approval of the animal care committee (Regierung Oberbayern), with supervision by a veterinarian. Two TG mouse models were investigated in this study: Tau-P301S mice (P301S) and bigenic GSK-3 β \times Tau-P301L (biGT) mice, together with age-matched WT controls. Details on the animal models are provided in the supplemental materials.

Tau Small-Animal PET

Study Overview. A detailed overview of the different groups of mice and investigations performed is presented in Table 1. Test-retest small-animal PET scans were acquired in a subset of 7 P301S and C57BL/6 animals within 1 wk, using identical scanning parameters. To investigate the optimal time window for small-animal PET quantitation, complete 90-min dynamic recordings were acquired in P301S and corresponding WT mice; findings from these pilot scans defined the optimal acquisition window to be used in the larger biGT cohort.

Data Acquisition and Analyses. Data acquisition and reconstruction information is provided in the supplemental materials. In brief, summed dynamic (0–90 min after injection for P301S) and static frames (20–50 min after injection for biGT) were coregistered to an MRI mouse atlas (16) by a manual rigid-body transformation using the PMOD fusion tool (V3.5; PMOD Technologies Ltd.). The interpreter was masked to the type of mouse. A second experienced interpreter ensured accurate alignment. Volumes of interest (VOIs) were defined on the MRI mouse atlas (Fig. 1). In P301S animals receiving the full dynamic small-animal PET scan, parametric maps of binding potential (BP_{ND}) were calculated using a linear graphic method (17), with the cerebellar VOI serving as pathology-free reference tissue. Time-activity-curves of the brain stem, cranium, Harderian glands, and whole brain were extracted. Reference and target VOIs were used for calculation of ¹⁸F-THK5117 brain stem-to-cerebellum ($SUVR_{BST/CBL}$ in P301S) and entorhinal/amygdaloid-to-cerebellum $SUVR$ ratios ($SUVR_{ENT/CBL}$ in biGT) of the 20- to 50-min frame.

Interpreter-Independent Coregistration. For final VOI- and statistical parametric mapping (SPM)-based small-animal PET analyses, an interpreter-independent coregistration was established after validation of the optimal 20- to 50-min window. Further details are provided in the supplemental materials.

SPM. For whole-brain voxelwise comparisons between groups of TG versus pooled WT mice, SPM was performed using SPM5 routines (Wellcome Department of Cognitive Neurology) implemented in MATLAB (version 7.1; MathWorks Inc.) (10). Individual SUV maps from TG mice were also compared with pooled WT mice to calculate for each mouse a voxelwise z score map expressing the divergence in SDs from the WT group. Furthermore, we performed linear regression with tau load (%) as a vector in the entire groups of (young and old) P301S and biGT mice.

Immunohistochemistry

After completion of the final small-animal PET scans, phosphorylated tau was detected in postfixed brains with the monoclonal AT8 antibody (Thermo Scientific), which recognizes phospho-paired helical filaments-tau, phosphorylated at Ser202 and Thr205. A more detailed description of immunohistochemistry is provided in the supplemental materials. Tau load (%) was calculated as the summed area of all tau-positive cells relative to the area of regions of interest. These analyses were performed by an operator masked to the small-animal PET results.

Ex Vivo and In Vitro Autoradiography

Ex vivo autoradiography was performed in a subset of P301S and C57BL/6 animals killed while deeply anesthetized at 50 min after injection of 15.2 ± 3.4 MBq of ¹⁸F-THK5117, administered in 150 μ L of saline to a tail vein. In vitro autoradiography was performed in these and further mice; an overview of methods is shown in Table 1. A detailed description of the procedure is provided in the supplemental materials.

Statistics

Group comparisons of VOI-based small-animal PET results between TG cohorts and WT mice were assessed by 1-way ANOVA and the Tukey post hoc test for multiple comparisons using IBM SPSS Statistics (version 22.0; SPSS). For correlation analyses, Pearson coefficients of correlation (R) were calculated. A threshold of P less than 0.05 was considered to be significant for rejection of the null hypothesis. For the voxelwise group comparison of TG versus WT mice, 2-sample t tests were performed, with a significance threshold of P less than 0.001, uncorrected for multiple comparisons.

RESULTS

Dynamic VOI-Based Analyses and Methodology

VOI-based analyses of the dynamic small-animal PET data from P301S and C57BL/6 mice were performed to investigate ¹⁸F-THK5117 kinetics in the brain in relation to the influence of

TABLE 1
Study Overview

Mouse strain	Age (mo)	Mean weight \pm SD (g)	Small-animal PET scan (n)	Immunohistochemistry AT8 staining (n)	Autoradiography ex vivo (n)	Autoradiography in vitro (n)	Mean small-animal PET $SUVR \pm$ SD for brain stem	Mean AT8 tau load \pm SD (%)	Mean small-animal PET $SUVR \pm$ SD for entorhinal/amygdala	Mean AT8 tau load \pm SD (%)
P301S	5.5	28.3 ± 4.1	4	2	2	2	1.15 ± 0.04	10.4/11.2		
	8–11	26.1 ± 5.8	7	7	3	3	$1.31 \pm 0.05^*$	38.6 ± 20.0		
WT	6–22	30.4 ± 4.8	25	2	5	5	1.17 ± 0.05	0		
biGT	12	29.7 ± 4.5	8	8		2			$1.16 \pm 0.04^*$	11.4 ± 7.4
	21	28.1 ± 5.5	8	8		2			$1.17 \pm 0.03^*$	14.3 ± 5.8
WT	6–22	30.4 ± 4.8	25	2	5	5			1.01 ± 0.04	0

* $P < 0.001$; 2-sample t test.

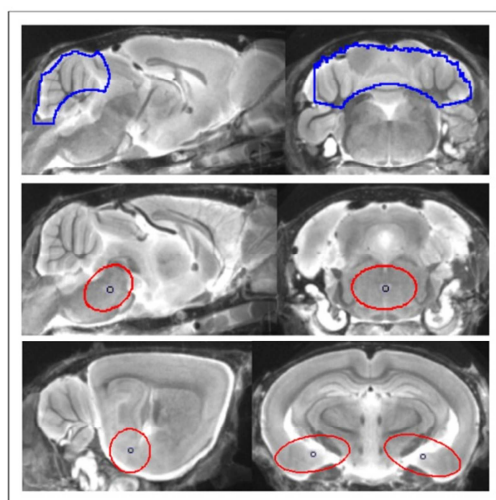


FIGURE 1. Definitions of VOIs projected on mouse brain MRI atlas (16) in sagittal and coronal slices: cerebellar VOI (top row; 55 mm³; blue line), oval-shaped brain stem VOI including central parts of pons and mid-brain (middle row; 11 mm³; red line), and bilateral spheric entorhinal cortex/amygdala (bottom row; 7 mm³ each; red line).

spillover from extracerebral structures and to define an optimal time window for static small-animal PET recordings. Mean (\pm SD) brain stem-to-cerebellum ratios in P301S mice aged 5.5 and 8–11 mo and for pooled WT mice aged 6–12 mo are shown in Figure 2A. Extracerebral activities (cranium, Harderian glands) in relation to whole-brain activity are shown in Figure 2B. The time-activity curves suggest the attainment of equilibrium binding in the brain by about 15 min after injection. Cranial uptake exceeded brain activity at times after 25 min, and progressive uptake in Harderian glands gives rise to potential cerebral spill-in after 50 min. These findings together suggested the use of an early static time frame to avoid distortion of brain time-activity curves. Additionally, attention was required for assessing ¹⁸F-THK5117 uptake in the frontal brain because this region was potentially vulnerable to spill-in from the Harderian glands, even at early time points.

There was a high correlation of BP_{ND} in all VOIs calculated for the entire 90-min recordings with the SUVR ($R = 0.85$, $P < 0.001$) for the time frame 20–50 min after injection (Fig. 2C). Test-retest analyses showed 20- to 50-min $SUVR_{BST/CBL}$ values in the entire study group to be robust for the brain stem target region ($R = 0.95$, $P < 0.001$; Fig. 2D). The mean variability in test-retest in that VOI was 1.2%, with a maximum variability of 2.5%.

VOI-Based Small-Animal PET Analyses

VOI-based analyses revealed significant SUVR differences in the brain stem of aged P301S animals compared with pooled WT mice (+11%; $P < 0.001$) (Fig. 3A; Table 1). In the younger P301S mice examined at the age of 5.5 mo, the brain stem signal was in the range of WT mice (1.18 ± 0.04 vs. 1.16 ± 0.05). There was a significantly higher ¹⁸F-THK5117 uptake in the entorhinal

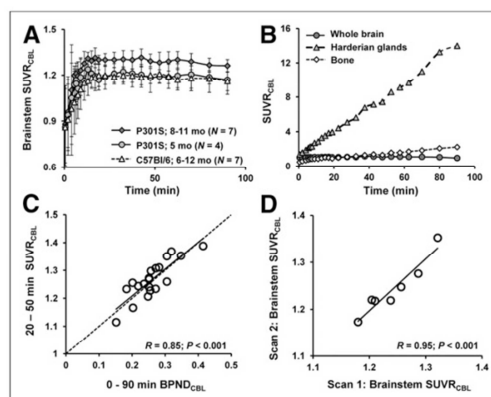


FIGURE 2. (A) Brain stem-to-cerebellum ratios as functions of time after ¹⁸F-THK5117 administration in groups of 5.5- and 8- to 11-mo-old TG P301S mice and pooled C57BL/6 WT mice (6–12 mo). Error bars are SD. (B) Tissue-to-cerebellum ratios as functions of time after ¹⁸F-THK5117 administration as assessed in 4 mice with C57BL/6 background demonstrating substantial cranial uptake. (C) Correlation of ¹⁸F-THK5117 BP_{ND} assessed from 90-min dynamic small-animal PET recordings with SUVR results (brain stem/cerebellum) from 20- to 50-min static frame, estimated from brain stem VOI in all TG and WT mice. Dotted line is line of identity ($BP_{ND} = SUVR-1$). (D) Test-retest correlation of brain stem-to-cerebellum SUVR in static 20- to 50-min frame.

cortex/amygdala VOI from biGT mice at age 12 (+14.9%; $P < 0.001$) and 21 mo (+15.2%; $P < 0.001$) compared with pooled WT mice (Fig. 3B; Table 1).

Voxelwise Analyses

Voxelwise group contrasts between TG and WT animals are shown in Figure 4. From this exploratory approach, we could discern significant differences in ¹⁸F-THK5117 uptake between P301S and pooled WT mice in a brain stem cluster (3,105 voxels; $P < 0.01$). The largest uptake differences in biGT versus pooled WT SUVR were found in a cluster comprising the entorhinal and piriform cortices as well as in the amygdalo-hippocampal formation and the lateral hypothalamus at age 12 (109,366 voxels; $P < 0.001$) and 21 (138,786 voxels; $P < 0.001$) mo. Smaller clusters for both biGT groups were also observed in the parietal and frontal neocortex (12 mo, 6,204 voxels, $P < 0.001$; 21 mo, 6,605 voxels, $P < 0.001$), whereas an additional cluster spreading along the piriform and orbitofrontal cortices and into the basal forebrain (17,630 voxels; $P < 0.001$) was distinctly apparent in aged biGT mice.

Immunohistochemical Validation

P301S mice revealed AT8-positive tau deposition predominantly in the brain stem, and penetrating into the cerebellar peduncles, lesser amounts in the forebrain, and complete absence in the cerebellar hemispheres. In the 2 mice examined at the age of 5.5 mo, the brain stem tau loads were 10% and 11%, whereas in 8- to 11-mo-old P301S mice, the mean brain stem tau load was $39\% \pm 20\%$ ($n = 7$; range, 15%–65%). Small-animal PET results correlated highly with the immunohistochemical quantitation of tau deposits in the brain stem ($R = 0.8$; $P < 0.001$; Fig. 5A). A cluster of significant correlation was found in the central part of

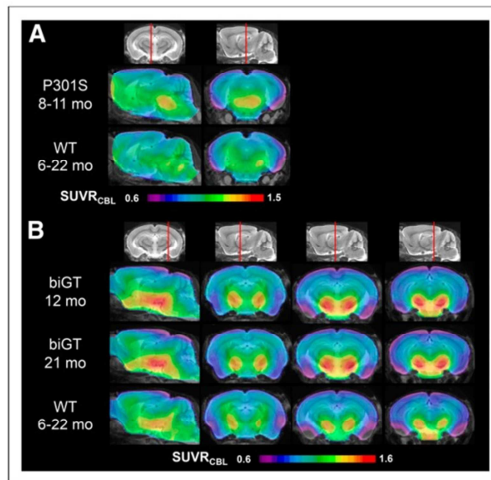


FIGURE 3. Mean parametric SUVR images in sagittal and coronal planes of ^{18}F -THK5117 uptake for aged P301S and WT controls (A) and likewise for young and old biGT and WT controls (B) projected on MRI mouse atlas (gray scale).

the brain stem (4,078 voxels; $P < 0.05$; Fig. 5A), whereas the patterns of z score maps deriving from single-mouse SPM were consistently congruent with the pattern of AT8 staining (Fig. 5A).

biGT mice showed a distinct regional distribution of AT8-positive tau deposits, with highest amounts in the entorhinal/piriform cortex and the adjacent amygdala, followed by the hippocampal formation, and with lesser amounts in the basal forebrain. One of 8 mice aged 12 mo was tau-negative, with a mean entorhinal/amygdala tau load of $11.4\% \pm 7.4\%$ (range, 0.0%–19.4%). All biGT mice aged 21 mo had tau deposits, with

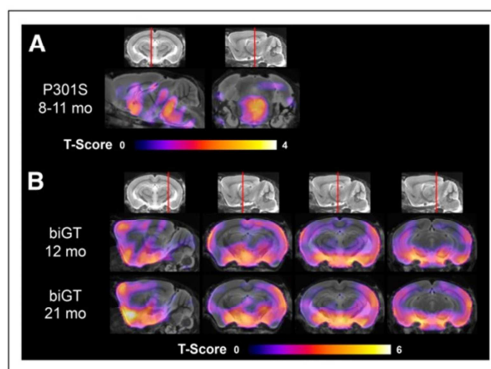


FIGURE 4. Mean voxelwise z score maps in sagittal and coronal planes of ^{18}F -THK5117 binding for groups of aged P301S vs. pooled WT mice (A) and likewise for young and old biGT mice vs. pooled WT mice (B). Results of 2-sample t test are expressed as z score maps projected on MRI mouse atlas (gray scale).

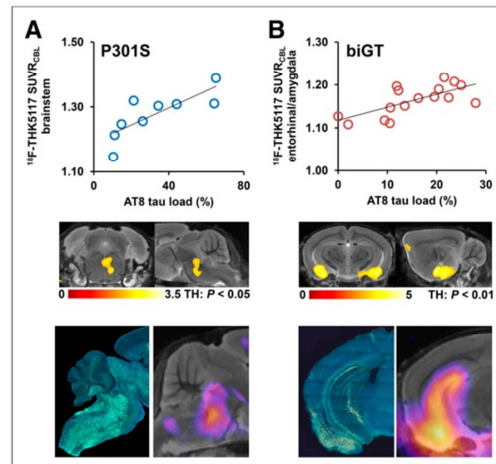


FIGURE 5. Validation of ^{18}F -THK5117 small-animal PET results by immunohistochemical AT8 staining in vitro for P301S (A) and biGT (B) mice. Top row shows correlation plots of tau load (%) in corresponding AT8-stained areas with ^{18}F -THK5117 SUVR. Middle row depicts linear regression by SPM (uncorrected for multiple comparisons, $k > 20$ voxels) between tau load (%) and small-animal PET SUVR images projected on MRI mouse atlas. Bottom row illustrates AT8-stained sections from single mice along with their individual SPM-derived z score maps (projected on MRI mouse atlas).

a group mean tau load in the inferior temporal region of $14.3\% \pm 5.8\%$ (range, 8.5%–23.8%; not significant vs. TG 12 mo). Small-animal PET results correlated highly with the immunohistochemical findings in the entorhinal/amygdala VOI ($R = 0.7$; $P < 0.001$; Fig. 5B). The 2 measures correlated significantly in bilateral clusters centered on the amygdala (49,788 voxels; $P < 0.01$; Fig. 5B), whereas the z score maps from single-mouse SPM were also congruent with the AT8 staining pattern (Fig. 5B).

Autoradiography and Blocking Experiments

Representative autoradiographic findings ex vivo and in vitro in P301S and C57BL/6 animals are illustrated along with corresponding small-animal PET binding ratio images in Figures 6A and 6B. In biGT mice, complete blocking of saturable radioligand binding was achieved by the addition of cold radioligand (Fig. 6C).

DISCUSSION

We present the first, to our knowledge, small-animal PET study with an ^{18}F -labeled radiotracer for hyperphosphorylated tau in large groups of 2 distinct TG mouse models and in WT littermates. Small-animal PET imaging with ^{18}F -THK5117 affords sensitive discrimination of tau pathology between both TG strains and WT animals, despite the several challenges presented by limited spatial resolution relative to the scale of target structures, low specific signal, and the inherent interanimal variability of tau deposition. Indeed, considerable stability of our small-animal PET procedure for in vivo quantitation of hyperphosphorylated tau burden was proven in test-retest studies, and small-animal PET gave results concurring closely with immunohistochemical findings and autoradiography. The detection of tauopathy, which is generally hampered

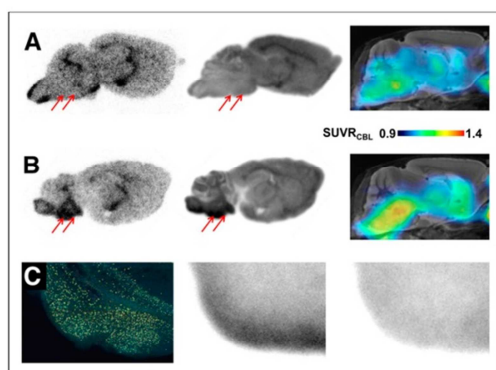


FIGURE 6. (A) Corresponding sagittal planes for autoradiography ex vivo (50 min after injection), autoradiography in vitro, and small-animal PET (SUVR_{CBL} 20–50 min after injection) from individual 12-mo-old C57BL/6 mouse expressing low ^{18}F -THK5117 uptake in brain stem (red arrows). (B) Corresponding sagittal planes for autoradiography ex vivo (50 min after injection), autoradiography in vitro, and small-animal PET (SUVR_{CBL} 20–50 min after injection) from 11-mo-old P301S mouse characterized by elevated ^{18}F -THK5117 uptake in brain stem (red arrows). (C) AT8 staining in tau-rich entorhinal, postpiriform, and amygdaloid cortex of biGT mouse aged 21 mo (coronal plane), along with corresponding in vitro autoradiography of ^{18}F -THK5117 binding without (middle) and with blocking (right) by excess nonradioactive THK5117.

by high unspecific background binding of the tracer, was enhanced by voxelwise SPM approaches.

Reference Region and Scan Window

The configuration of a suitable reference tissue region for the analysis of small-animal PET brain imaging of the rodent brain is critical. The reference region must be devoid of the targeted binding site or pathology and should provide robust reference values for semiquantitative analyses of the tau pathology (14). Our present immunohistochemical analysis showed some tau deposition in the cerebellar peduncles of aged P301S mice. Therefore, we were obliged to edit the cerebellum template so as to avoid this source of specific binding signal, which might otherwise have biased the estimation of BP_{ND} in VOIs (18).

Dynamic small-animal PET shows that ^{18}F -THK5117 rapidly attains a plateau concentration in living mouse brain, whereas radioactivity continues to accumulate in certain extracerebral regions during prolonged small-animal PET scans. Radioactivity in the cranium, which reflects defluorination of the tracer, increases linearly with time, exceeding the global cerebral mean uptake at times after 30 min after injection. However, intense bone uptake was present only in 4 animals and was most prominent in foci within the frontal bone; as we have noted earlier in mouse small-animal PET with the dopamine receptor tracer ^{18}F -desmethoxyfallypride (19), we do not expect substantial brain spill-in arising from bone for ^{18}F -THK5117 scans lasting less than 60 min. However, the linear uptake in the Harderian glands soon becomes substantial and could well contaminate brain signal during late acquisition frames, especially for the nearby frontal cortex. This possibility was minimized through our use of early acquisition frames. In any case, we find that binding ratios attain a stable equilibrium in only 10 min. Binding

ratios from the 20- to 50-min static frame correlated well with BP_{ND} values from full dynamic recordings lasting 90 min. Thus, this early time window serves admirably as a convenient surrogate of the more physiologically defined BP_{ND} . Furthermore, with brief scans, the duration of anesthesia is minimized without compromising the sensitivity of the endpoint measure.

Background/Low Binding

Although SUVRs in target regions are significantly higher in P301S and biGT mice than in their controls, the magnitude of the ratios is low, even in regions with demonstrably high tau deposition. Two factors should be considered in this regard. First, the ^{18}F -THK5117 background binding, especially in regions with abundant white matter (i.e., the brain stem), is relatively high and consequently hampers the detection of specific binding signal, even in those regions with high tau deposition. This limitation of ^{18}F -THK5117 small-animal PET is made clear by comparing unspecific binding in WT mice and the increment in tau-positive animals, which seldom exceeds 20%, despite heavy tau load in target regions. Thus, for example, increments are relatively low in the high-background brain stem target region of aged P301S animals (1.17 SUVR background in WT; 11% difference in TG mice with 38% tau load). Quantitation is more favored in the low-background entorhinal cortex/amygdala target region of biGT mice (1.01 SUVR background in WT; 15% difference in TG with 14% tau load). We do note that an earlier investigation with ^{18}F -THK523 in rTG4510 mice (20) found a 48% higher global brain uptake when compared with WT (21). We cannot fully account for this discrepancy but suppose that different methodologic approaches and strain-dependent tracer kinetics may be relevant factors.

A second factor in our relatively low target-binding ratios might be related to the imperfect concordance of ^{18}F -THK5117 binding to the prevailing conformation of the tau deposits in frontotemporal dementia mice (22). Although the exact binding site of radiotracers to tau fibrils remains to be identified, the paired helical filaments described in postmortem AD material are more effectively targeted by 2-arylquinolines than is the tauopathy in frontotemporal dementia (23). Present data allow us to predict that the higher signal in small-animal PET relative to the lower tau deposition in biGT mice (in contrast to P301S) may be indicative of a more AD-like phosphorylation induced by GSK3- β , resulting in a fibrillar aggregation more similar to that observed in AD brain (24). Nevertheless, the saturable ^{18}F -THK5117 binding in regions with high tau deposition in both mouse models was blocked by cold tracer. We used AT8 immunohistochemistry to confirm staining of tau aggregates (25), which showed colocalization with methoxy-X04 stained β -sheet structures (Supplemental Fig. 2). Although aged P301S mice contain mainly frontotemporal dementia-like half-twisted ribbons, they also express AD-like paired helical filaments (26). It remains a challenge to elucidate the affinities of ^{18}F -THK5117 for the tau conformations prevailing in different TG mouse models; indeed, this should be a priority to be addressed in future studies.

Voxelwise Approach

Tau depositions in P301S and biGT mice are not restricted to foci but rather occur at multiple sites encompassing wide parts of the cerebrum, as is likewise the case for tau distribution in human AD pathology (27). Nonetheless, some differences in distribution

are evident in the present TG mouse models. Thus, VOI-based analyses of tau-rich regions in groups of TG mice are feasible but may miss individual heterogeneities in tau pathology. In this regard, voxelwise analyses present distinct advantages by interrogating tau levels in each voxel of the mouse brain, without prior assumptions of distribution patterns in individuals (Supplemental Fig. 1). Statistically defined voxel clusters of increased ^{18}F -THK5117 binding in our TG mouse groups matched the immunohistochemical patterns, validating group comparisons by these methods (Fig. 4). However, z score analyses in single mice proved fit for monitoring tauopathy in brains of individual mice (Fig. 5). Voxelwise comparisons present similar advantages for monitoring β -amyloid deposition by small-animal PET (10).

Suitability for In Vivo Therapy Monitoring

Despite the massive (60%) tau load in certain affected regions of aged P301S mice, we found an SUVR of only 11% increase by small-animal PET. As noted above, this discrepancy may be related to conformational hindrance of ligand binding in vivo. Moreover, P301S mice aged 8–11 mo are moribund and intolerant of narcosis compared with age-matched controls. Thus, P301S mice may not present a favorable model for prospectively monitoring antitau treatments by serial ^{18}F -THK5117 small-animal PET studies.

In contrast, biGT mice offer a longer life span, because their motor function is much less affected by tau pathology, and they manifestly tolerate narcosis and small-animal PET scans even at the old age of 21 mo. We observed regional variability in the tau deposition in entorhinal/amygdala and hippocampus regions (Supplemental Fig. 1) but only a slight increase in tau binding between 12 and 21 mo of age. As such, the biGT model may not be ideally suited for longitudinal intervention studies. However, as in our earlier experience with β -amyloid mice, sensitive detection of treatment effects should be enhanced by undertaking individual baseline small-animal PET recordings, so as to accommodate better the variability of the trajectories of pathology; baseline scanning can also be used to assign individual animals so as to obtain optimally matched subgroups, as proposed in our earlier work (28). The P301S and biGT models both showed a rather high detection threshold to small-animal PET, corresponding to approximately 10% or more tau load based on gold standard histopathologic examination. Although tau load is thus difficult to quantify in young animals, the robust detection by ^{18}F -THK5117 small-animal PET in older mice should afford the necessary sensitivity to support studies of interventional therapy.

Issues dealing with the frontal hot spot, translational aspects, and background of control animals can be found in the supplemental materials.

CONCLUSION

Preclinical in vivo imaging of tau pathology by mouse small-animal PET is feasible and gives results strongly correlating with immunohistopathologic and autoradiographic gold standard estimates. The logistically convenient 20–50 min after injection acquisition after intravenous ^{18}F -THK5117 injection yields robust and reproducible SUVRs and greatly minimizes the risk of cerebral spill-over from cranium and extracerebral sources. The relatively low ^{18}F -THK5117 target-to-reference ratios in the mouse brain need to be considered but can be compensated by voxelwise SPM data analysis, which improves the sensitivity for detecting

regional gradients in the tau pathology in single animals. In vivo assessment of the characteristic interanimal heterogeneity in tau accumulation may well enhance the statistical power of future interventional studies with follow-up to individual baseline levels. A matter still to be resolved is the impact of strain-specific configurations of tau deposition on small-animal PET studies with ^{18}F -THK5117.

DISCLOSURE

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked “advertisement” in accordance with 18 USC section 1734. The study was financially supported by the Synergy Cluster, the Friedrich-Baur-Stiftung (73/15), and the Foundation for Polish Science within the International PhD project ‘Studies of nucleic acids and proteins—from basic to applied research,’ cofinanced from the European Union—Regional Development Fund (MPD/2009-3/2). No other potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGMENTS

A part of this paper originated from the doctoral thesis of Federico Probst. We thank Karin Bormann-Giglmaier and Rosel Oos for excellent technical assistance. We thank the LEGTEGG (KULeuven) alumni for their technical and scientific contributions. The authors acknowledge Inglewood Biomedical Editing for professional editing of the manuscript.

REFERENCES

1. Ziegler-Graham K, Brookmeyer R, Johnson E, Arrighi HM. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer’s disease incidence rates. *Alzheimers Dement*. 2008;4:316–323.
2. Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, et al. The Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement*. 2012;8:S1–S68.
3. Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2009;118:5–36.
4. Denk F, Wade-Martins R. Knock-out and transgenic mouse models of tauopathies. *Neurobiol Aging*. 2009;30:1–13.
5. Hall AM, Roberson ED. Mouse models of Alzheimer’s disease. *Brain Res Bull*. 2012;88:3–12.
6. Teipel SJ, Buchert R, Thome J, Hampel H, Pahnke J. Development of Alzheimer-disease neuroimaging-biomarkers using mouse models with amyloid-precursor protein-transgene expression. *Prog Neurobiol*. 2011;95:547–556.
7. Zimmer ER, Leuzy A, Bhat V, Gauthier S, Rosa-Neto P. In vivo tracking of tau pathology using positron emission tomography (PET) molecular imaging in small animals. *Transl Neurodegener*. 2014;3:6.
8. Zimmer ER, Parent MJ, Cuervo AC, Gauthier S, Rosa-Neto P. MicroPET imaging and transgenic models: a blueprint for Alzheimer’s disease clinical research. *Trends Neurosci*. 2014;37:629–641.
9. Brendel M, Jaworska A, Griessinger E, et al. Cross-sectional comparison of small animal [^{18}F]-florbetaben amyloid-PET between transgenic AD mouse models. *PLoS One*. 2015;10:e0116678.
10. Rominger A, Brendel M, Burgold S, et al. Longitudinal assessment of cerebral beta-amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant beta-amyloid precursor protein using ^{18}F -florbetaben PET. *J Nucl Med*. 2013;54:1127–1134.
11. Snellman A, Lopez-Picon FR, Rokka J, et al. Longitudinal amyloid imaging in mouse brain with ^{11}C -PIB: comparison of APP23, Tg2576, and APPsw-PS1dE9 mouse models of Alzheimer disease. *J Nucl Med*. 2013;54:1434–1441.
12. Maruyama M, Shimada H, Suhara T, et al. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron*. 2013;79:1094–1108.

13. Okamura N, Furumoto S, Harada R, et al. Novel ^{18}F -labeled arylquinoline derivatives for noninvasive imaging of tau pathology in Alzheimer disease. *J Nucl Med*. 2013;54:1420–1427.
14. Villemagne VL, Okamura N. In vivo tau imaging: obstacles and progress. *Alzheimers Dement*. 2014;10:S254–S264.
15. Tago T, Furumoto S, Okamura N, et al. Synthesis and preliminary evaluation of 2-arylhydroxyquinoline derivatives for tau imaging. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2014;57:18–24.
16. Dorr A, Sled JG, Kabani N. Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *Neuroimage*. 2007;35:1409–1423.
17. Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Ding YS, Alexoff DL. Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:834–840.
18. Constantinescu CC, Mukherjee J. Performance evaluation of an Inveon PET preclinical scanner. *Phys Med Biol*. 2009;54:2885–2899.
19. Rominger A, Mille E, Boning G, et al. α 2-adrenergic drugs modulate the binding of [^{18}F]fallypride to dopamine D2/3 receptors in striatum of living mouse. *Synapse*. 2010;64:654–657.
20. Santacruz K, Lewis J, Spire T, et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 2005;309:476–481.
21. Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, et al. ^{18}F -THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain*. 2011;134:1089–1100.
22. Shah M, Catafau AM. Molecular Imaging Insights into Neurodegeneration: Focus on Tau PET Radiotracers. *J Nucl Med*. 2014;55:871–874.
23. Fodero-Tavoletti MT, Furumoto S, Taylor L, et al. Assessing THK523 selectivity for tau deposits in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease tauopathies. *Alzheimers Res Ther*. 2014;6:11.
24. Crespo-Biel N, Theunis C, Borghgraef P, et al. Phosphorylation of protein tau by GSK3 β prolongs survival of bigenic Tau.P301LxGSK3 β mice by delaying brainstem tauopathy. *Neurobiol Dis*. 2014;67:119–132.
25. Lemoine L, Saint-Aubert L, Marutle A, et al. Visualization of regional tau deposits using (3)H-THK5117 in Alzheimer brain tissue. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3:40.
26. Allen B, Ingram E, Takao M, et al. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci*. 2002;22:9340–9351.
27. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991;82:239–259.
28. Brendel M, Jaworska A, Herms J, et al. Amyloid-PET predicts inhibition of de novo plaque formation upon chronic gamma-secretase modulator treatment. *Mol Psychiatry*. 2015;20:1179–1187.

7. Literaturverzeichnis

- Allen, B., E. Ingram, M. Takao, M. J. Smith, R. Jakes, K. Virdee, H. Yoshida, M. Holzer, M. Craxton and P. C. Emson (2002). "Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein." Journal of Neuroscience **22**(21): 9340-9351.
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte and B. T. Hyman (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." Neurology **42**(3): 631-631.
- Bermejo-Pareja, F., J. Benito-León, S. Vega, M. Medrano, G. Román and N. D. i. C. S. S. Group (2008). "Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain." Journal of the neurological sciences **264**(1-2): 63-72.
- Brendel, M., A. Jaworska, F. Overhoff, T. Blume, F. Probst, F.-J. Gildehaus, P. Bartenstein, C. Haass, B. Bohrmann and J. Herms (2018). "Efficacy of chronic BACE1 inhibition in PS2APP mice depends on the regional A β deposition rate and plaque burden at treatment initiation." Theranostics **8**(18): 4957.
- Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham and H. M. Arrighi (2007). "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease." Alzheimer's & dementia **3**(3): 186-191.
- Cramer, P. E., J. R. Cirrito, D. W. Wesson, C. D. Lee, J. C. Karlo, A. E. Zinn, B. T. Casali, J. L. Restivo, W. D. Goebel and M. J. James (2012). "ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models." science **335**(6075): 1503-1506.
- Crespo-Biel, N., C. Theunis, P. Borghgraef, B. Lechat, H. Devijver, H. Maurin and F. Van Leuven (2014). "Phosphorylation of protein Tau by GSK3 β prolongs survival of bigenic Tau. P301Lx GSK3 β mice by delaying brainstem tauopathy." Neurobiology of disease **67**: 119-132.
- Deussing, M., T. Blume, L. Vomacka, C. Mahler, C. Focke, A. Todica, M. Unterrainer, N. L. Albert, S. Lindner and B. von Ungern-Sternberg (2018). "Data on specificity of [18F] GE180 uptake for TSPO expression in rodent brain and myocardium." Data in brief **19**: 331-336.
- Dickens, A. M., S. Vainio, P. Marjamäki, J. Johansson, P. Lehtiniemi, J. Rokka, J. Rinne, O. Solin, M. Haaparanta-Solin and P. A. Jones (2014). "Detection of microglial activation in an acute model of neuroinflammation using PET and radiotracers 11C-(R)-PK11195 and 18F-GE-180." Journal of nuclear medicine **55**(3): 466-472.
- Edison, P., H. A. Archer, A. Gerhard, R. Hinz, N. Pavese, F. E. Turkheimer, A. Hammers, Y. F. Tai, N. Fox and A. Kennedy (2008). "Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R) PK11195-PET and [11C] PIB-PET study." Neurobiology of disease **32**(3): 412-419.
- Götz, J., F. v. Chen, J. Van Dorpe and R. Nitsch (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils." Science **293**(5534): 1491-1495.
- Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide." Nature reviews Molecular cell biology **8**(2): 101-112.
- Harada, R., N. Okamura, S. Furumoto and K. Yanai (2018). "Imaging protein Misfolding in the brain using β -sheet ligands." Frontiers in neuroscience **12**: 585.
- Heneka, M. T., M. J. Carson, J. El Khoury, G. E. Landreth, F. Brosseron, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica and R. M. Ransohoff (2015). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." The Lancet Neurology **14**(4): 388-405.
- Herukka, S.-K., M. Hallikainen, H. Soininen and T. Pirttilä (2005). "CSF A β 42 and tau or phosphorylated tau and prediction of progressive mild cognitive impairment." Neurology **64**(7): 1294-1297.
- Hickman, S. E. and J. El Khoury (2014). "TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease." Biochemical pharmacology **88**(4): 495-498.
- Kril, J. J., S. Patel, A. J. Harding and G. M. Halliday (2002). "Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation." Acta neuropathologica **103**(4): 370-376.
- Lee, H.-g., G. Perry, P. I. Moreira, M. R. Garrett, Q. Liu, X. Zhu, A. Takeda, A. Nunomura and M. A. Smith (2005). "Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector?" Trends in molecular medicine **11**(4): 164-169.

Lemoine, L., L. Saint-Aubert, A. Marutle, G. Antoni, J. P. Eriksson, B. Ghetti, N. Okamura, I. Nennesmo, P.-G. Gillberg and A. Nordberg (2015). "Visualization of regional tau deposits using 3 H-THK5117 in Alzheimer brain tissue." Acta neuropathologica communications **3**(1): 40.

Leuzy, A., K. Chiotis, L. Lemoine, P.-G. Gillberg, O. Almkvist, E. Rodriguez-Vieitez and A. Nordberg (2019). "Tau PET imaging in neurodegenerative tauopathies—still a challenge." Molecular psychiatry **24**(8): 1112-1134.

Logan, J., J. S. Fowler, N. D. Volkow, G.-J. Wang, Y.-S. Ding and D. L. Alexoff (1996). "Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **16**(5): 834-840.

Lyoo, C. H., M. Ikawa, J.-S. Liow, S. S. Zoghbi, C. L. Morse, V. W. Pike, M. Fujita, R. B. Innis and W. C. Kreisl (2015). "Cerebellum can serve as a pseudo-reference region in Alzheimer disease to detect neuroinflammation measured with PET radioligand binding to translocator protein." Journal of Nuclear Medicine **56**(5): 701-706.

Maruyama, M., H. Shimada, T. Suhara, H. Shinotoh, B. Ji, J. Maeda, M.-R. Zhang, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee and M. Ono (2013). "Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls." Neuron **79**(6): 1094-1108.

Mawuenyega, K. G., W. Sigurdson, V. Ovod, L. Munsell, T. Kasten, J. C. Morris, K. E. Yarasheski and R. J. Bateman (2010). "Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease." Science **330**(6012): 1774-1774.

Oddo, S., V. Vasilevko, A. Caccamo, M. Kitazawa, D. H. Cribbs and F. M. LaFerla (2006). "Reduction of soluble A β and tau, but not soluble A β alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles." Journal of Biological Chemistry **281**(51): 39413-39423.

Okamura, N., S. Furumoto, R. Harada, T. Tago, T. Yoshikawa, M. Fodero-Tavoletti, R. S. Mulligan, V. L. Villemagne, H. Akatsu and T. Yamamoto (2013). "Novel 18F-labeled arylquinoline derivatives for noninvasive imaging of tau pathology in Alzheimer disease." Journal of Nuclear Medicine **54**(8): 1420-1427.

Organization, W. H. (2012). Dementia: a public health priority, World Health Organization.

Ozmen, L., A. Albientz, C. Czech and H. Jacobsen (2009). "Expression of transgenic APP mRNA is the key determinant for beta-amyloid deposition in PS2APP transgenic mice." Neurodegenerative Diseases **6**(1-2): 29-36.

Poisnel, G., A.-S. Hérard, N. E. T. El Tayara, E. Bourrin, A. Volk, F. Kober, B. Delatour, T. Delzescaux, T. Debeir and T. Rooney (2012). "Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease." Neurobiology of aging **33**(9): 1995-2005.

Popp, J. and S. Arlt (2011). "Pharmacological treatment of dementia and mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease." Current opinion in psychiatry **24**(6): 556-561.

Price, A. R., G. Xu, Z. B. Sieminski, L. A. Smithson, D. R. Borchelt, T. E. Golde and K. M. Felsenstein (2013). "Comment on "ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models". " Science **340**(6135): 924-924.

Querfurth, H. W. and F. M. LaFerla (2010). "Mechanisms of disease." N Engl J Med **362**(4): 329-344.

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

Rojas, S., J. R. Herance, J. D. Gispert, S. Abad, É. Torrent, X. Jiménez, D. Pareto, U. Perpiña, S. Sarroca and E. Rodríguez (2013). "In vivo evaluation of amyloid deposition and brain glucose metabolism of 5XFAD mice using positron emission tomography." Neurobiology of aging **34**(7): 1790-1798.

Rominger, A., M. Brendel, S. Burgold, K. Keppler, K. Baumann, G. Xiong, E. Mille, F.-J. Gildehaus, J. Carlsen and J. Schlichtiger (2013). "Longitudinal assessment of cerebral β -amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant β -amyloid precursor protein using 18F-florbetaben PET." Journal of Nuclear Medicine **54**(7): 1127-1134.

Schneider, L. S. (2013). "Alzheimer disease pharmacologic treatment and treatment research." CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology **19**(2): 339-357.

Son, H. J., Y. J. Jeong, H. J. Yoon, S. Y. Lee, G.-E. Choi, J.-A. Park, M. H. Kim, K. C. Lee, Y. J. Lee and M. K. Kim (2018). "Assessment of brain beta-amyloid deposition in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with PET imaging agents 18 F-flutemetamol and 18 F-florbetaben." BMC neuroscience **19**(1): 45.

Terwel, D., D. Muyliaert, I. Dewachter, P. Borghgraef, S. Croes, H. Devijver and F. Van Leuven (2008). "Amyloid activates GSK-3 β to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice." The American journal of pathology **172**(3): 786-798.

Villemagne, V. L., M. T. Fodero-Tavoletti, C. L. Masters and C. C. Rowe (2015). "Tau imaging: early progress and future directions." The Lancet Neurology **14**(1): 114-124.

Yokokura, M., N. Mori, S. Yagi, E. Yoshikawa, M. Kikuchi, Y. Yoshihara, T. Wakuda, G. Sugihara, K. Takebayashi and S. Suda (2011). "In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease." European journal of nuclear medicine and molecular imaging **38**(2): 343-351.

Zhao, Q., M. Liu, L. Ha, Y. Zhou and A. s. D. N. Initiative (2019). "Quantitative 18F-AV1451 brain tau PET imaging in cognitively normal older adults, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease patients." Frontiers in neurology **10**.

Zimmer, E. R., A. Leuzy, V. Bhat, S. Gauthier and P. Rosa-Neto (2014). "In vivo tracking of tau pathology using positron emission tomography (PET) molecular imaging in small animals." Translational neurodegeneration **3**(1): 6.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Axel Rominger für die Überlassung dieser Arbeit und der immer freundlich konstruktiven Zusammenarbeit. Herrn Dr. Matthias Brendel möchte ich insbesondere für die exzellente Einarbeitung in das Thema und die technische Unterstützung für Auswertemethodik sowie der Initiierung aller Kontakte und die immer gut gelaunte und motivierte Art bei der Arbeit danken. Hier ist der Funke mehr als nur einmal übergesprungen. Weiterhin möchte ich Felix Overhoff, meinem Mitkollegen danken: zu zweit ließ sich vieles besser erreichen. Ganz Besonders möchte ich Karin Bormann-Giglmaier und Rosel Oos für die vielen Stunden der Arbeitsunterstützung bis spätabends und die immer herzliche Hilfe danken.

Ohne die moralische Unterstützung meiner Familie und Freunde wäre dies zudem deutlich schwieriger gewesen, daher auch an dieser Stelle mein tiefer Dank.