

Tomographieverfahren bei kleinen Nagern als ein prädiktives Modell zur Darstellung pathologischer Marker bei Morbus Alzheimer

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biologin
Beate Rösner
geboren am 21.04.1972 in Köthen

2009

Referentin: PD Dr. Manuela Gernert

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung
Tierärztliche Hochschule Hannover

Korreferent: Appl. Prof. Dr. Ulrich Ebert

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung
Tierärztliche Hochschule Hannover und Abbott GmbH & Co. KG
Ludwigshafen

Drittprüfer: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo

Institut für Biophysik der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 02.07.2009

Zusammenfassung

Morbus Alzheimer zählt zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen bei Menschen. Trotz deutlicher Fortschritte bei der Erforschung pathologischer Grundlagen des Morbus Alzheimer ist die aktuelle Pharmakotherapie symptomatisch. Zurzeit existiert keine therapeutische Möglichkeit, die Progression der Erkrankung aufzuhalten oder gar umzukehren. Das Ziel ist daher die Entwicklung neuer Pharmakotherapien, welche direkt an den neuropathologischen Mechanismen von Morbus Alzheimer ansetzen. Für entsprechende Forschungsarbeiten müssen umfangreiche präklinische Untersuchungen durchgeführt werden. Diese tierexperimentellen Studien erfordern häufig zeitintensive histologische Untersuchungen. Eine Alternative könnten zeitsparende bildgebende Methoden, wie z.B. Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET), sein. Allerdings wurden diese Techniken bisher hauptsächlich bei der pathologischen Grundlagenforschung verwendet. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, Tomographieverfahren bei kleinen Nagern als ein prädiktives Modell zur Darstellung pathologischer Marker bei Morbus Alzheimer zu charakterisieren. Dazu wurde untersucht, ob schnelle *in vivo* Tomographieverfahren ein adäquater Ersatz zur zeitintensiven histologischen Auswertung sein können. Darüber hinaus wurde deren Nutzen für die Arzneimittelentwicklung im Rahmen einer präklinischen passiven Immunisierungsstudie untersucht. Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen demonstrieren, dass spezielle Tomographieverfahren für kleine Nagetiere für präklinische pathologische und therapeutische Studien *in vivo* sehr gut geeignet sind.

Mikroblutungen im Gehirn sind eine wichtige Nebenwirkung von passiver Immuntherapie in Amyloid-Precursor-Protein (APP) transgenen Mäusen, dem wichtigsten präklinischen Modell für Morbus Alzheimer. Sowohl intrakranielle Blutablagerungen als auch kleine zerebrale Mikroblutungen im Kortex konnten in der vorliegenden Studie mittels MRT relativ genau detektiert werden. Beide konnten als Signalverluste im T2*-gewichteten Kontrast beobachtet werden. Ferner konnte der T2*-gewichtete MRT-Kontrast für eine longitudinale Überwachung zur Entstehung von Mikroblutungen eingesetzt werden. Während der Untersuchungen wurden auch abnorme Signalverluste im T2*-gewichteten MRT in subkortikalen Bereichen, insbesondere im Thalamus festgestellt. Diese Signale wiesen eine deutlich veränderte Morphologie auf und waren daher sehr gut von den Mikroblutungen abzugrenzen. Die Mikroblutungen im MRT konnten histologisch verifiziert werden. Trotz der sehr guten Korrelation der Resultate beider Methoden fiel die Anzahl der histologisch ermittelten Mikroblutungen aber deutlich höher aus. Die Ursache hierfür war die Limitierung des MRTs bei der räumlichen Auflösung, weshalb nur Mikroblutungen ab einer Größe von 60 μm im

MRT dargestellt werden konnten. Die abnormen hypointensen Signale im Thalamus wurden histologisch als Kalziumablagerungen nachgewiesen. Sie enthielten weder Eisen noch färbten sie sich als amyloide Plaques. Im Gegensatz zu früheren Veröffentlichungen konnten in dieser Arbeit generell keine amyloiden Plaques im MRT dargestellt werden, weder mit noch ohne Hilfe des Kontrastmittels FSB.

Die passive Immunisierung mit zwei monoklonalen anti-A β Antikörpern in alten APP transgenen Mäusen hatte einen Anstieg der Mikroblutungen gegenüber der vehikel-behandelten Kontrollgruppe zur Folge. Beide Antikörper bestätigten daher diese Nebenwirkung aus anderen veröffentlichten histologischen Antikörperstudien. In der vorliegenden Studie konnte im MRT zusätzlich die Entstehung neuer Mikroblutungen im Behandlungsverlauf gezeigt werden, was eine wichtige Verbesserung dieses Modells darstellt.

Eine veränderte neuronale Aktivität ist ein pathologisches Merkmal bei Morbus Alzheimer-Patienten. Diese Veränderung spiegelt sich u.a. im Glukosestoffwechsel wider. Aus diesem Grunde wurde in einer weiteren Studie der Glukosestoffwechsel bei APP transgenen Mäusen mittels PET und 2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose untersucht. Die transgenen Mäuse wiesen gegenüber den nicht-transgenen Mäusen einen altersabhängigen Hypermetabolismus auf. Die gezeigten PET-Ergebnisse konnten histologisch verifiziert werden. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit kein eindeutiger Einfluss des anti-A β Oligomer Antikörpers A-887755 auf die neuronale Aktivität nachgewiesen werden.

Trotz der kontinuierlichen technischen Weiterentwicklung der Tomographen, unterliegen sowohl das MRT als auch das PET Limitierungen. Vor allem dem räumlichen Auflösungsvermögen sind Grenzen gesetzt, was besonders bei den relativ kleinen Gehirnstrukturen von Nagetieren zum Tragen kommt. Dennoch sind Tomographien in präklinischen Studien hilfreich. Sie ermöglichen Untersuchungen während der Lebendphase, so dass pathologische Phänomene, wie z.B. die Entstehung von Mikroblutungen, und physiologische Parameter, wie z.B. neuronale Aktivität, im Verlauf einer Pharmakotherapie in APP transgenen Mäusen beobachtet werden können. Dadurch können im Vergleich zum herkömmlichen histologischen Nachweis die Resultate wesentlich früher gewonnen werden, was wiederum frühere Entscheidungen in Bezug auf weitere Vorgehensweisen oder etwaige Änderungen im Studienablauf ermöglicht. Zusätzlich können mittels *in vivo* Tomographien Nebenwirkungen, wie z.B. das Auftreten von Aneurysmen und Mikroblutungen, eher beobachtet und darauf gegebenenfalls reagiert werden. Allerdings besitzt die Histologie auch Vorteile gegenüber dem MRT, besonders die Vielfalt an Nachweismethoden und die teilweise höhere Empfindlichkeit hinsichtlich bestimmter Parameter. Ein weiterer Vorteil der

Zusammenfassung

histologischen Analyse ist der Kostenfaktor. Histologische Untersuchungen kosten nur einen Bruchteil von tomographischen Analysen. Trotzdem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit den sinnvollen Nutzen und die Effizienz von modernen nicht-invasiven Verfahren im Rahmen von präklinischen Studien gegenüber histologischen Untersuchungen.

Schlagwörter: MRT, PET, präklinische Immunisierungsstudien, Morbus Alzheimer

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is one of the most frequent neurodegenerative diseases in humans. Despite clear progress in research of pathological basic principles of AD, the current pharmacotherapy is only symptomatically. At present no therapy exists to stop or slow down disease progress. Therefore, a primary goal of the development of an improved pharmacotherapy is to directly influence the pathological mechanism of AD. The necessary research requires extensive preclinical analysis. Related animal studies include time-consuming histological experiments. Alternative techniques could be time-saving imaging methods, such as magnetic resonance tomography (MRI) and positron emission tomography (PET). These tomography methods have mainly been used in preclinical animal models so far to study pathological mechanisms. One goal of this thesis was to characterize tomography in rodents as a predictive model for pathological markers at AD. For this purpose, rapid *in vivo* tomographic techniques were compared with time-consuming *ex vivo* histological methods to see if tomography could be an adequate replacement for histology. In addition its benefits for drug development were investigated in a preclinical passive immunization study. The results showed that the use of specific tomography techniques for small rodents is helpful in preclinical pathological and therapeutical studies.

Cerebral microhemorrhages are an important side effect of a passive immunization in APP transgenic mice, which is the most important preclinical model for AD. Intracranial blood deposits as well as small cerebral cortical microhemorrhages could exactly be detected using MRI. Both could be identified as hypointense signals in images using T2*-weighted contrast. Furthermore, the T2*-weighted MRI contrast can be deployed for longitudinal monitoring of the development of microhemorrhages. In this study abnormal signals were also found in T2*-weighted MRI in subcortical regions, especially in thalamus. These signals showed a diversified morphology and could be clearly separated from microhemorrhages. The microhemorrhages in MRI were histologically verified. Despite the good correlation between both methods, the number of histological identified microhemorrhages was significantly higher. The reason for this finding is the limited spatial resolution in MRI, therefore only microhemorrhages with a size of 60 μm or larger could be detected. Furthermore, the nature of the abnormal hypointense signals was also identified by histological stainings. The thalamic signals turned out to be calcifications. The detected calcifications did not contain either iron ions or amyloid plaque material. In contradiction to prior literature, in this work it was impossible to identify amyloid plaques in MRI, neither by using contrast agent FSB nor without.

Abstract

The passive immunization with two monoclonal antibodies against A β in old APP transgenic mice caused an increase of microhemorrhages compared to the non-transgenic control group. Both antibodies confirmed that microhemorrhages occur as unwanted side effect as previously published with passive immunization in histological studies. The present study demonstrated the possibility to observe the development of new microhemorrhages with MRI during antibody treatment, which is an important improvement of this model.

A changed neuronal activity is a characteristic feature in AD patients. This alteration is reflected in a modified glucose metabolism. Therefore, in an additional study, the glucose metabolism in APP transgenic mice was investigated using PET and 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose. The transgenic mice showed an age-dependent hypermetabolism in opposite to non-transgenic mice. The shown PET results were verified using 2-deoxy-D-glucose autoradiography. However, an influence of the anti-A β oligomer antibody A-887755 on neuronal activity was not found.

Despite ongoing technical improvement both MRI and PET have limitations. Importantly the spatial resolution is restricted, which is in particular limiting when investigating the small brain structures of rodents. Nevertheless, this technology provides great benefits in preclinical studies. Imaging techniques allow investigations of living animals, so that monitoring of pathological phenomena, for example development of microhemorrhages, and physiologic parameters, for example neuronal activity, during a pharmacotherapy in mice is possible. Thus, results could be obtained earlier than with conventional histological methods, therefore allowing earlier decisions on further procedure or possible modifications in study design. Also, side effects, e.g. aneurysms and microhemorrhages, could be detected earlier. However, histological analysis has also some benefits, especially the variety of staining possibilities and the higher sensitivity. Another advantage of histology is the lower costs which are just a minor fractional of tomography costs. In summary, the results of this thesis demonstrate clear benefits and some examples of efficient use of modern non-invasive investigation methods in preclinical studies compared to conventional histological studies.

Keywords: MRI, PET, preclinical immunization, Alzheimer's disease

1. Einleitung	1
1.1. Morbus Alzheimer	1
1.1.1. Klinische Symptome.....	2
1.1.2. Neuropathologie.....	3
1.1.2.1. Beta Amyloid-Protein.....	4
1.1.2.2. Presenilin.....	7
1.1.2.3. ApoE.....	7
1.1.2.4. Tau-Protein.....	8
1.1.3. Therapie.....	8
1.2. Präklinische Modelle	12
1.3. Tomographieverfahren	13
1.3.1. Magnetresonanztomographie.....	13
1.3.1.1. Grundlagen.....	13
1.3.1.2. Einsatzmöglichkeiten.....	15
1.3.2. Positronen-Emissions-Tomographie.....	16
1.3.2.1. Grundlagen.....	16
1.3.2.2. Entwicklungen.....	17
1.3.2.3. Einsatzmöglichkeiten.....	18
1.4. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	22
2.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen mittels MRT	22
2.1.1. Versuchstiere.....	22
2.1.2. Operativer Eingriff.....	22
2.1.3. Magnetresonanztomographie.....	24
2.1.4. Histologie.....	26
2.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer Aβ-Antikörperbehandlung	26
2.2.1. Versuchstiere.....	27
2.2.2. Nachweis von Mikroblutungen mittels MRT und Histologie.....	27
2.2.2.1. Magnetresonanztomographie.....	27
2.2.2.2. Histologie.....	28
2.3. Ergänzende Untersuchung durch histologische Marker	29
2.3.1. Amyloide Plaques.....	29
2.3.1.1. 6G1-Antikörper.....	29
2.3.1.2. Kongorot-Färbung.....	30
2.3.2. Nissl-Färbung.....	30
2.3.3. Kalziumnachweis.....	31
2.4. Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung	31
2.4.1. Versuchstiere.....	31
2.4.2. Magnetresonanztomographie.....	32
2.4.3. Histologie.....	33

2.5. Nachweis von amyloiden Plaques mittels MRT	33
2.5.1. Nachweis von amyloiden Plaques ohne zusätzliche Markierung.....	33
2.5.2. Nachweis von amyloiden Plaques mittels FSB-Markierung.....	34
2.5.2.1. Histologische Überprüfung der FSB-Plaquerbindung	34
2.5.2.2. Bestimmung des Detektionslevels mittels MRT.....	34
2.5.2.3. Ex vivo Plaquerfärbung mittels FSB-Markierung	35
2.5.2.4. In vivo Plaquerfärbung mittels FSB-Markierung.....	36
2.6. Einfluss einer chronischen Aβ-Antikörperbehandlung auf den Metabolismus	36
2.6.1. Versuchstiere.....	37
2.6.2. PET-Untersuchung mit ¹⁸ FDG	37
2.6.3. Histologie.....	38
2.6.3.1. ¹⁴ C-2-Deoxy-D-Glukose	39
2.6.3.2. Cytochrom-Oxidase C.....	39
2.7. Auswertung und Statistik	40
2.7.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen mittels MRT	40
2.7.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer A β -Antikörperbehandlung	41
2.7.3. Ergänzende Untersuchung von histologischen Markern	42
2.7.3.1. Amyloide Plaques	42
2.7.3.2. Nissl-Färbung	42
2.7.3.3. Kalziumnachweis	43
2.7.4. Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung.....	43
2.7.5. Nachweis von amyloiden Plaques mittels MRT.....	44
2.7.6. Einfluss einer chronischen A β -Antikörperbehandlung auf den Metabolismus.....	44
3. Ergebnisse	47
3.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen mittels MRT	47
3.1.1. Korrelation der Daten vom MRT und des injizierten Blutvolumens.....	47
3.1.2. Korrelation der histologischen Daten und des injizierten Blutvolumens.....	48
3.1.3. Korrelation der berechneten Volumina von MRT und Histologie	49
3.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer Aβ-Antikörperbehandlung	50
3.2.1. Nachweis mittels MRT	50
3.2.2. Nachweis mittels Histologie	55
3.2.3. Vergleich von MRT und Histologie.....	59
3.3. Ergänzende Untersuchung von histologischen Markern	60
3.3.1. Auswirkungen der anti-A β Antikörperbehandlung auf amyloide Plaques.....	60
3.3.2. Nissl-Färbung	64
3.3.3. Kalziumnachweis	65
3.4. Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung	67

3.5. Nachweis von amyloiden Plaques mittels MRT	70
3.5.1. Nachweis von amyloiden Plaques ohne zusätzliche Markierung	70
3.5.2. Nachweis von amyloiden Plaques mittels FSB-Markierung	71
3.5.2.1. Histologische Überprüfung der FSB-Plaquerbindung.....	72
3.5.2.2. Bestimmung des Detektionslevels mittels MRT	72
3.5.2.3. Ex vivo Plaquerfärbung mittels FSB-Markierung	73
3.5.2.4. In vivo Plaquerfärbung mittels FSB-Markierung	75
3.6. Einfluss einer chronischen Aβ-Antikörperbehandlung auf den Metabolismus	76
3.6.1. PET-Untersuchung mit ¹⁸ FDG	76
3.6.2. ¹⁴ C-2-Deoxy-D-Glukose.....	81
3.6.3. Cytochrom-Oxidase C	82
3.6.4. Vergleich der Methoden	84
4. Diskussion	87
4.1. Können kleine Blutablagerungen im Gehirn von Versuchstieren nachgewiesen werden?.....	87
4.2. Können pharmakologisch induzierte Mikroblutungen nachgewiesen werden?	89
4.3. Kann der zeitliche Verlauf von pharmakologisch induzierten Mikroblutungen nachgewiesen werden?.....	92
4.4. Können amyloide Plaques nachgewiesen werden?.....	93
4.5. Kann ein pharmakologischer Einfluss auf die Plaquerdichte histologisch verifiziert werden?.....	96
4.6. Können die hypointensen Signale im Thalamus durch ergänzende histologische Marker abgeklärt werden?	97
4.7. Kann eine pharmakologische Beeinflussung des Metabolismus nachgewiesen werden?.....	99
4.8. Ausblick	103
5. Literaturverzeichnis	105
6. Anhang	122
6.1. Geräte und Materialien	122
6.1.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen im MRT.....	122
6.1.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer A β -Antikörperbehandlung	122
6.1.3. Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung	123
6.1.4. Ergänzende Untersuchung von histologischen Markern.....	124
6.1.5. Nachweis von Plaquer in lebenden Tieren mittels FSB.....	124
6.1.6. PET-Untersuchungen.....	125

Abkürzungen

AAALAC	Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (Assoziation für die Beurteilung und Akkreditierung der Pflege von Labortieren)
A β	Amyloid-beta-Peptid
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer's disease (Morbus Alzheimer)
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinasen (Disintegrin und Metalloproteinasen)
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein (amyloides Vorläuferprotein)
APP/Lo	London-Mutation von APP [B6,FVB/N - Tg(APP/V717)]
BOLD	Blood Oxygen Level Dependent (Sauerstofflevel im Blut abhängig)
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
^{11}C , ^{14}C	Kohlenstoffisotope
ca.	zirka
COX	Cytochrom-Oxidase C
CT	Röntgencomputertomographie
3D	dreidimensional
2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
DAB	3,3'-Diaminbenzidin Tetrahydrochlorid Hydrat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulphoxid
et al.	und andere
^{18}F , ^{19}F	Fluorisotope
FAD	Familial Alzheimer's Disease
FDG	2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose
FSB	(E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)stryrylbenzen
FLASH	Fast Low Angle Shot (Gradientenechosequenz)
FOV	Field of View (Messfeld)
g	Gramm
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase
^1H	Protonen
Hz	Hertz
IACUC	Institutional Animal Care and Use Committee (Komitee zur Fürsorge und Verwendung von Tieren)
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
IRW	Inveon Research Workplace (Inveon Forschungsarbeitsplatz)
i.v.	intravenös
kBq	Kilobecquerel
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LRP	Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (Lipoproteinrezeptor-verwandtes Protein mit geringer Dichte)
M	Molar
μCi	Mikrocurie
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µm ³	Kubikmikrometer
mM	Millimolar
MRI	magnetic resonance imaging (Magnetresonanztomographie)
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MSME	Multi Slice and Multi Echo Sequence (mehrfach Schnitt- und mehrfach Echosequenzen)
n	Anzahl der Tiere
OSEM	Ordered Subsets Expectation-Maximization (geordnete Untermengen Erwartungsmaximierung)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PET	positron emission tomography (Positronen-Emissions-Tomographie)
PIB	Pittsburgh Compound-B (N-[¹¹ C]methyl-2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole)
PS1	Presenilin 1
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts (Rezeptor für gesteigerte Endproduktglykolisierung)
RARE	Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement (Turbo-Spinesequenzen)
RF	Radiofrequenz
ROI	Region of Interest (Region des Interesses)
SAD	Sporadic Alzheimer's Disease (sporadisch auftretende Alzheimer-Erkrankung)
sAPP α	lösliches Amyloid-Precursor-Protein α
sAPP β	lösliches Amyloid-Precursor-Protein β
SUV	Standard Uptake Volume (Standard Aufnahmevolumen)
T	Tesla
T1	Spin-Gitter-Relaxationszeit
T2	Spin-Spin-Relaxationszeit
T2*	transversale Relaxation in Form des freien Induktionszerfalls
Tab.	Tabelle
Tg	transgen
Tg2576	Schwedische Mutation von humanen APP [B6;SJL-Tg(APP/SWE2576Kha)]
u.a.	unter anderem
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Morbus Alzheimer gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal der fortschreitende Verlust von Neuronen ist, der zu diversen neurologischen Symptomen wie z.B. Demenz- und Bewegungsstörungen führt. Bei Morbus Alzheimer kann die Degeneration in den unterschiedlichsten Lebensphasen auftreten, wobei der Krankheitsbeginn nach dem 60. Lebensjahr überwiegt. Der Verlauf ist in den meisten Fällen progressiv und endet letal. Obwohl Morbus Alzheimer mit mehr als 60 % den größten Anteil der neurodegenerativen Erkrankungen ausmacht, existieren auch weitere bedeutsame neuronale Degenerationen, wie z.B. Morbus Parkinson oder Chorea Huntington.

1.1. Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer wurde das erste Mal von Alois Alzheimer als eine organische Erkrankung beschrieben. Seine Erkenntnisse stammten von der Beobachtung der Patientin Auguste Deter, an der er folgende klinisch auffällige Verhaltensweisen diagnostizierte:

- krankhafte Eifersuchtsideen,
- zunehmende Gedächtnisschwäche,
- Unfähigkeit sich in gewohnter Umgebung zu Recht zu finden,
- Unvermögen bekannte Personen wieder zu erkennen.

Die beobachteten Symptome verstärkten sich im Lauf der Erkrankung kontinuierlich bis der Tod eintrat. Eine anschließende anatomische Untersuchung des Patientengehirns offenbarte bis dahin unbekannt Resultate. Die Gehirnsektion ergab eine Atrophie und zeigte nach der histologischen Aufarbeitung einen starken Neuronenverlust, „auffälliges Material“, veränderte Neurofibrillen in überlebenden Zellen und eine Wucherung der Glia (Alzheimer, 1907). Aufgrund dieser Erkenntnisse von Alois Alzheimer wurde 1911 der Begriff „Morbus Alzheimer“ geprägt.

Trotz dieser frühen Erkenntnisse von Alois Alzheimer begann erst in den 80er Jahren eine intensivere Erforschung der Grundlagen der Pathologie. Ferner wird heute intensiv an der Verbesserung der Pharmakotherapie geforscht. Der Antrieb hierfür liegt in dem stetig zunehmenden Altersdurchschnitt und der demzufolge ebenfalls steigenden Prävalenz- bzw. Inzidenzrate begründet (Tab. 1). Zählte man im Jahre 2000 eine Krankenzahl von ca. 935.000 in Deutschland, so schätzt man für das Jahr 2050 einen Anstieg auf ca. 2.290.000 Patienten (Bickel, 2000). Diese hohen Zuwachsraten bei Morbus Alzheimer haben eine erhebliche sozialökonomische Bedeutung. Unterstrichen wird diese Wichtigkeit durch die hohen Kosten von 43.800 € pro Alzheimerpatient und Jahr (Hallauer et al., 2000).

Alter	Mittlere Prävalenzrate [%]	Mittlere Inzidenzrate pro Jahr [%]
65-69	1,2	0,4
70-74	2,8	0,9
75-79	6,0	1,9
80-84	13,3	4,1
85-89	23,9	6,5
90 und älter	34,6	10,1

Tab. 1. Mittlere Prävalenz- und Inzidenzraten (Deutsche Alzheimer Gesellschaft, 2006)

1.1.1. Klinische Symptome

Grundsätzlich können der Verlauf und die Symptome von Morbus Alzheimer in drei Phasen unterteilt werden:

1. kognitive Defizite,
2. Verstärkung der kognitiven Defizite,
3. motorische Ausfälle.

Die einzelnen Phasen können nicht klar voneinander abgegrenzt werden und haben auch keine exakt definierte Dauer. In der ersten Phase überwiegen kognitive Defizite in Form von Gedächtnisverlust. Ferner haben die Betroffenen zunehmend Schwierigkeiten, Zusammenhänge zu erkennen und auftretende Problematiken zu lösen. Außerdem können Sinneseindrücke nicht mehr adäquat verarbeitet werden, so dass eine Reizüberflutung z.B. zu Panikattacken bei Betroffenen führen kann. Diese kognitiven Defizite werden von den Patienten bewusst wahrgenommen, aber häufig bagatellisiert bzw. verschleiert. Im Gegensatz dazu wird die zweite Phase von den Betroffenen selbst kaum mehr wahrgenommen, sondern hauptsächlich von den Angehörigen. Im weiteren Verlauf dieser Phase nehmen die kognitiven Ausfälle stetig zu. Hinzu kommt eine zunehmende Desorientierung und Unfähigkeit den Alltag zu meistern, wodurch eine ständige Hilfe bzw. Pflege der Patienten notwendig wird. Außerdem treten vermehrt Agnosie, Euphorie oder Depressionen auf. Bedingt durch diese Symptome verändert sich das Sozialverhalten der Patienten. Beim Übergang von der zweiten zur dritten Phase sind Beeinträchtigungen der motorischen Fähigkeiten sowie Sprachstörungen bis zum Verlust (Aphasie) zu verzeichnen. Im Verlauf schreiten die Beeinträchtigungen weiter voran. Es kommen Inkontinenz, Gehstörungen, unbeherrschbare Körperhaltung oder ausbleibender Schluckreflex hinzu. Im finalen Stadium tritt eine Immunschwäche auf, welche in der Regel durch eine Bronchitis zum Tode führt.

Die klinische Diagnostik einer Morbus Alzheimer-Erkrankung stützt sich im Wesentlichen auf die Anamnese, klinische Untersuchungen und auf die Feststellung von neuropsychologischen Defiziten. Für die Anamnese wird hauptsächlich die Historie der Erkrankung durch die Befragung von Angehörigen ermittelt. Die Patienten können aufgrund des langsamen

Erkrankungsbeginns entweder keine exakten Angaben machen oder sie verschleiern Fakten. Als klinische Untersuchungen können Blut-, Urin- und neuronale Untersuchungen (Liquor cerebrospinalis, Tomographien) durchgeführt werden. Dabei dienen die Blut- und Urinuntersuchungen in der Regel dem Ausschluss behandelbarer Demenzen. Ebenso kann die Diagnostik des Liquor cerebrospinalis zum Ausschluss einer anderen Erkrankung dienen, aber auch der Bestimmung des Amyloid-beta-Peptid- oder des Tau-Protein-Spiegels. Den Tomographien, wie z.B. Magnetresonanztomographie, Röntgencomputertomographie oder Positronen-Emissions-Tomographie, kommen bei der Abgrenzung von Morbus Alzheimer gegenüber anderen Demenzen eine wichtige Rolle zu (Knopman et al., 2001; Nordberg, 2007; Silverman et al., 2001). Mittels der Tomographien kann die Hirnatrophie, insbesondere Atrophie vom Hippocampus und entorhinalen Kortex, sowie die verminderten Stoffwechsellleistungen von Patienten festgestellt werden (Cummings, 2004; Krämer, 2000).

Für die Diagnose von neuropsychologischen Defiziten werden verschiedene kognitive Tests durchgeführt. Dazu gehören z.B. der Mini-Mental-Status (Folstein et al., 1975), der Syndrom-Kurztest (Erzigkeit, 1989), der Alzheimer-Krankheit Bewertungs-Maßstab (Mohs et al., 1983) und der Nürnberger Altersinventar (Oswald und Fleischmann, 1986).

Eine effektive Behandlung von Morbus Alzheimer-Patienten erfordert eine frühzeitige und gesicherte Diagnose. Erschwert wird dies durch eine schlechte Abgrenzung von Morbus Alzheimer gegenüber altersabhängigen kognitiven Verschlechterungen (Mild Cognitive Impairment). Aus diesem Grunde werden weitere diagnostische Merkmale (so genannte Biomarker) zur frühzeitigen sicheren Diagnostik von Morbus Alzheimer erforscht und entwickelt. Ein solcher Biomarker könnte z.B. der Nachweis von komplementärer Desoxyribonukleinsäure des Neural Thread Proteins (Nervenzellen spezifisches Protein) im Urin sein (AlzheimerAlert™; Goodman, 2008) oder die Untersuchung von Blut bzw. Liquor auf z.B. Apolipoprotein 4-Allel, Amyloid-beta-Peptid₁₋₄₂- oder Tau-Protein-Spiegel (Crystal und Davies, 2008; DeLeon et al., 2007; Ringman et al., 2008).

1.1.2. Neuropathologie

Die klinischen Symptome von Morbus Alzheimer treten erst Jahre bis Jahrzehnte nach dem Beginn der neuropathologischen zerebralen Veränderungen auf. Die pathologischen Modifikationen beginnen in kognitiv assoziierten Arealen, wie z.B. dem entorhinalen Kortex und der CA1-Region, und breiten sich im Verlaufe der Erkrankung in mit diesen Arealen

verschalteten kortikalen bzw. subkortikalen Strukturen aus (Arnold et al., 1991). Neuropathologisch wichtige Kennzeichen sind:

- Hirnatrophie, insbesondere der Hirnrinde im fronto-temporalen und parieto-okzipitalen Bereich (Du et al., 2007),
- massiver Neuronenverlust im Hippocampus und im Großhirn (Selkoe et al., 2002),
- Abnahme der Synapsendichte (Selkoe et al., 2002),
- Störung der Neurotransmitter Acetylcholin, Norepinephrin und Serotonin (Palmer et al., 1988; Pappas et al., 2000),
- erhöhte Produktion von Amyloid-beta-Peptid und Akkumulation zu senilen Plaques (Selkoe, 2001),
- Aggregation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Selkoe, 2001),
- Presenilin-Überexpression (Selkoe, 2001).

Morbus Alzheimer ist eine sehr heterogene Erkrankung und die Mehrheit der Fälle treten sporadisch auf (95 %; SAD = sporadic Alzheimer's disease) und sind nur sehr selten einer genetischen Familie zugeordnet (5 %; FAD = familial Alzheimer's disease). Beide Formen sind klinisch und neuropathologisch sehr ähnlich. Bei FAD konnten autosomal dominante Mutationen in drei Genen festgestellt werden: Amyloid-Precursor-Protein (0,5 %), Presenilin 1 (39 %) und Presenilin 2 (0,5 %). Allerdings sind 60 % der genetischen Mechanismen bei FAD noch nicht abgeklärt. Überexpression vom Allel 4 des auf Chromosom 19 lokalisierten Apolipoproteins E stellen einen Risikofaktor für Morbus Alzheimer dar (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993; Selkoe, 2001).

1.1.2.1. *Beta Amyloid-Protein*

Das Amyloid-Precursor-Protein (APP) ist ein Typ 1-Transmembranprotein, welches aus 695-770 Aminosäuren besteht. Durch eine Proteolyse von APP mittels α -, β - und γ -Sekretase wird das Amyloid-beta-Peptid ($A\beta$) gebildet. Die Spaltung von APP kann auf zwei Wegen erfolgen, entweder nicht-amyloid oder amyloid (Abb. 1). Die nicht-amyloide Spaltung in lösliches Amyloid-Precursor-Protein α (sAPP α ; 105-125 kDa) und C83 (10 kDa) erfolgt durch die α -Sekretase, bestehend aus ADAM-9, ADAM-10 und ADAM-17 (A Disintegrin and Metalloproteinasen; Kojro und Fahrenholz, 2005). Die Spaltung erfolgt ausgehend vom C-Terminus an der Aminosäure 83. Das lösliche sAPP α wird anschließend in den extrazellulären Raum sezerniert (Haass et al., 1993; Kojro und Fahrenholz, 2005) und ist bei neuronalen Zellantworten beteiligt, unterstützt die Proliferation einiger Zelltypen, beeinflusst die Regulation von Kalzium und steigert die Gedächtnisleistungen (Furukawa et al., 1996;

Mattson et al., 1993; Meziane et al., 1998; Mucke et al., 1996). Bei Morbus Alzheimer-Patienten wurden reduzierte α -Sekretase-Aktivitäten und verminderte Mengen an sAPP α im Liquor cerebrospinalis festgestellt (Colciaghi et al., 2002; Lannfelt et al., 1995; Sennvik et al., 2000).

Im Gegensatz dazu erfolgt die APP-Spaltung auf dem amyloiden Weg durch die β -Sekretase an der Aminosäure 99. Das abgespaltene lösliche Amyloid-Precursor-Protein β (sAPP β) wird in den extrazellulären Raum abgegeben, wohingegen C99 in der Membran verbleibt. Dieses C99 wiederum wird durch den Enzymkomplex γ -Sekretase zwischen den Aminosäuren 38-43 gespalten. Das abgespaltene A β (38-43 kDa; Monomere) besteht in der Regel aus 40 Aminosäuren (A β_{1-40}) und nur sehr selten aus 42 Aminosäuren (A β_{1-42}). Die A β_{1-42} -Variante ist hydrophober und neigt stärker zur Fibrillenbildung als die A β_{1-40} -Variante, weshalb die zerebralen unlöslichen amyloiden Plaques hauptsächlich aus A β_{1-42} bestehen (Jarrett et al., 1993). Die Wege zur A β -Aggregation sind polymorph, u.a. gehören die Fibrillen- und Oligomerbildung dazu. Die Fibrillenbildung erfolgt durch die Polymerisation von A β_{1-42} -Monomeren zu Protofibrillen und abschließend zu stabilen A β -Fibrillen mit β -Faltblattstruktur (Lomakin et al., 1996). Bei der alternativen Aggregation multimerisieren A β_{1-42} -Monomere zu Oligomeren mit einer unterschiedlichen Anzahl von Monomeren. Mit der alternativen Aggregation können Dimere, Trimere und größere Komplexe gebildet werden (Roher et al., 1996). Durch Selbstorganisation können sich weiterhin aus zwölf Monomeren stabile Globulomere entwickeln (Barghorn et al., 2005; Gellermann et al., 2008). A β -Monomere werden in fast jeder neuronalen Zelle produziert, allerdings ist ihre physiologische Rolle noch unklar.

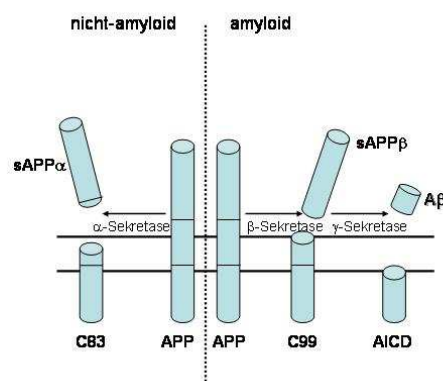


Abb. 1. Entstehung von Amyloid-beta-Peptid durch die Spaltung vom Amyloid-Precursor-Protein (Erläuterungen siehe Text)

A β kommt im Gehirn, im Liquor cerebrospinalis und im Blutplasma vor. Unter physiologischen Konditionen besteht ein Gleichgewicht von A β im Blutplasma und im Gehirn. Während im Gehirn A β nur in ungebundener Form auftritt, liegen im Plasma sowohl

gebundene als auch ungebundene freie A β -Formen vor. A β kann sich an Plasmaproteine binden, wie z.B. Albumin, Apolipoprotein, Lipoprotein u.a. (Biere et al., 1996; Webster und Rogers, 1996). Die gebundene A β -Form verhindert eine Fibrillenbildung, reduziert das freie A β und ermöglicht den Abbau von A β über die Leber und die Niere. Basierend auf der „Sink-Hypothese“ führt eine verringerte A β -Plasmakonzentration zu einem verstärkten Transport von freiem A β aus dem Gehirn in das Plasma. Dadurch verringert sich wiederum die A β -Konzentration im Gehirn, wodurch die Bildung von amyloiden Plaques reduziert wird. Der Transport von A β erfolgt über die Blut-Hirn-Schranke mit Hilfe der zwei Rezeptoren RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts; Deane et al., 2003; Mackic et al., 1998; Yan et al., 1996) und LRP-1 (Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein; Sagare et al., 2007; Shibata et al., 2000). RAGE ist in den A β -Transport vom Plasma in das Gehirn involviert, wohingegen LRP-1 beim Rücktransport eine Rolle spielt. Eine Störung des Gleichgewichtes führt zu einem Anstieg von A β im Gehirn und somit möglicherweise zu einer verstärkten Fibrillen- oder Oligomerbildung.

Eine ursprünglich stark favorisierte Hypothese der Ursache für Morbus Alzheimer stellte eine gesteigerte A β_{1-42} -Produktion in direktem kausalen Zusammenhang mit einer vermehrten Ablagerung von amyloiden Plaques und somit zu kognitiven Defiziten (sogenannte Amyloid-Kaskade; Hardy und Higgins, 1992; Hardy und Selkoe, 2002). Die Ergebnisse neuerer Studien führten zu einer Relativierung dieser Hypothese (Hardy, 2006). Obwohl amyloide Plaques bei *in vitro* Experimenten neurotoxisch waren (Lorenzo und Yankner, 1994), konnte bei *in vivo* Versuchen nur ein schwacher Zusammenhang zwischen den Plaques und Demenz nachgewiesen werden (Dodart et al., 2002; Katzman et al., 1988; Kotilinek et al., 2002; Näslund et al., 2000). Die fibrillären A β enthaltenden Plaques treten hauptsächlich in hippocampalen und assoziierten kortikalen Strukturen auf. Im Gegensatz zu den Plaques weist das Auftreten von nicht-fibrillärem, löslichem A β einen stärkeren Zusammenhang mit synaptischen Verlusten und Demenz auf (McLean et al., 1999; Lue et al., 1999). Lösliche A β -Präparationen enthalten neben A β -Monomeren auch Dimere, Trimere und höhere Oligomere, welche an synaptische Spines binden und erregende Synapsen zerstören (Lambert et al., 1998; Shankar et al., 2007; Shankar et al., 2008). Die daraus resultierende gestörte Langzeitpotenzierung wiederum kann zu kognitiven Defiziten führen (Selkoe, 2002; Townsend et al., 2006; Walsh et al., 2002; Walsh, 2008). A β -Oligomere besitzen somit ein größeres neurotoxisches Potential als amyloide Plaques mit fibrillärem A β .

Mehrere Genmutationen sind bei APP (Chromosom 21) bekannt. Diese Mutationen befinden sich sowohl in intronischen als auch exonischen Bereichen des APP-Gens (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991). Beschriebene Mutationen von APP sind Schwedisch, London, Indiana und Arktis (Goate et al., 1991; Mullan et al., 1991; Murrell et al., 1991; Nilsberth et al., 2001). Trotz der Heterogenität der Mutationen ergeben sich die gleichen biochemischen Defekte und neuropathologischen Charakteristika von Morbus Alzheimer.

1.1.2.2. Presenilin

Die γ -Sekretase ist ein integraler Membranproteinkomplex. Dieser Enzymkomplex besteht aus Presenilin, Nicastrin, Anterior Pharynx Defective 1 (Anterior Pharynx Defekt) und Presenilin Enhancer 2 (Presenilin Verstärker) und wird im endoplasmatischen Retikulum gebildet (Haass und Selkoe, 2007). Die Aspartat-Protease Presenilin enthält die katalytische Komponente der γ -Sekretase und ist daher in die Spaltung von sAPP α und sAPP β involviert (Abb. 1; Haass und Steiner, 2002; Wolfe et al., 1999). Für die Aktivierung des Komplexes wird Presenilin durch eine autokatalytische Spaltung in zwei Untereinheiten geteilt, ein N-terminales und ein C-terminales Fragment. Diese beiden Fragmente scheinen die biologisch wirksamen Formen des Presenilins zu sein und befinden sich in einem Gleichgewicht (Selkoe, 2001). Die anderen Komplexkomponenten tragen im Wesentlichen zur Stabilisierung des γ -Sekretasekomplexes bei.

Presenilin kann auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sein. Während bei dem auf Chromosom 14 liegenden Presenilin 1-Gen mehr als 150 Mutationen festgestellt werden konnten, sind es beim Presenilin 2-Gen auf Chromosom 1 nur zehn Mutationen (DeStrooper, 2007). Aufgrund von Mutationen des katalytischen Presenilins verändert sich die Spezifität der γ -Sekretase, woraus eine gesteigerte Produktion von A β ₁₋₄₂ auf Kosten von A β ₁₋₄₀ resultiert (DeStrooper, 2007; Selkoe, 2001). Mutationen in Presenilin 1 führen zu einem sehr frühen Auftreten und progressiven Verlauf von Morbus Alzheimer (Selkoe, 2001).

1.1.2.3. ApoE

Apolipoprotein E (ApoE) gehört zu den Lipoproteinen, welche hauptsächlich in der Leber und zum Teil im Gehirn exprimiert werden. Codiert sind die ApoE-Gene auf Chromosom 19. Im Gegensatz zu ApoE2 und ApoE3 erhöht ein Polymorphismus beim Allel 4 das Erkrankungsrisiko um 70 % für spät auftretende Morbus Alzheimer-Erkrankungen (Corder et

al., 1993; Saunders et al., 1993). Dieser Polymorphismus bei ApoE4 ist mit einer Überproduktion von zerebralem A β und der daraus resultierenden hippocampalen Atrophie, neuronalem Zellverlust und verschlechterter neuronalen Plastizität assoziiert (Arendt et al., 1997; Mori et al., 2002; Schmechel et al., 1993). Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen sind jedoch noch unbekannt. Bisher konnte gezeigt werden, dass die pathologischen Merkmale aufgrund einer veränderten Isoform-spezifischen Interaktion von ApoE4 und A β auftreten (Belinson et al., 2008; Donahue und Johanson, 2008; Ye et al., 2005).

1.1.2.4. *Tau-Protein*

Ein weiteres wichtiges neuropathologisches Merkmal von Morbus Alzheimer ist das Auftreten von intrazellulären neurofibrillären Bündeln. Diese intrazellulären helikalen oder linearen Bündel bestehen aus aggregierten hyperphosphorylierten Tau-Proteinen (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986). Aufgrund der Fähigkeit vom Tau-Protein zur Aggregation und seiner Bindungsfähigkeit an Mikrotubuli trägt es unter normalen Bedingungen zur Ausbildung einer stabilen Mikrotubulstruktur bei. Reguliert wird die Aggregatbildung dabei durch den Phosphorylierungsgrad vom Tau-Protein. Die Phosphorylierung wiederum wird durch Proteinkinasen und -phosphatasen, wie z. B. GSK 3 gesteuert (Baki et al., 2004; Hanger et al., 1992; Lucas et al., 2001). Eine Störung des enzymatischen Systems führt zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, wodurch eine Bindung an Mikrotubulstrukturen verhindert wird. Stattdessen polymerisiert das abnorme Tau-Protein zu neurofibrillären Bündeln und die Instabilität der Mikrotubuli führt zu einem verringerten Transport von Molekülen und Organellen und trägt dadurch zum Zelltod bei (Kosik et al., 1986).

1.1.3. Therapie

Die optimale Therapie setzt sich sowohl aus pharmakologischen als auch nichtpharmakologischen Interventionen zusammen. Bei der nichtpharmakologischen Therapie werden vor allem psychosoziale Aspekte behandelt. Dazu gehört eine psychotherapeutische Betreuung sowohl für Patienten als auch für deren Angehörige. Ferner gehören speziell auf den Patienten abgestimmte Programme in Form von Musiktherapie, sensorische Stimulationen, Bewegungsübungen und Training der täglichen Abläufe dazu (Doody et al., 2001).

Die aktuelle Pharmakotherapie erfolgt ausschließlich symptomatisch, wobei es verschiedene Ansatzpunkte gibt:

- *Acetylcholinesterasehemmer*: Sie werden zur Kompensation der verminderten Acetylcholinsynthese durch degenerierte cholinerge Neuronen eingesetzt. Häufig verwendete Medikamente sind Donepezil (Aricept; Eisai/Pfizer) und Rivastigmin (Exelon; Novartis). Beide Substanzen hemmen die Cholinesterasen und somit den enzymatischen Abbau von Acetylcholin (Melnikova, 2007; Saddichha und Pandey, 2008). Die Behandlung mit Acetylcholinesterasehemmern führt zu einer moderaten Verbesserung der kognitiven Symptome und verzögert die Progression.
- *Neuroleptika*: Sie werden zur Behandlung von Erregungs- und Unruhezuständen verwendet.
- *Glutamaterge Neurotransmission*: Memantin (Namenda; Forest/Lundbeck) ist ein selektiver N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonist und bewirkt eine Verbesserung der glutamatergen Neurotransmission (Melnikova, 2007; Saddichha und Pandey, 2008). Daher steigert Memantin leicht die Lern- und Gedächtnisfunktion bei Morbus Alzheimer-Patienten. Im therapeutischen Dosisfenster, bei dem Nebenwirkungen ausgeschlossen werden können, besitzt es allerdings keine neuroprotektiven Eigenschaften (Creeley et al., 2006).

Obwohl die gegenwärtigen Therapiemöglichkeiten die Symptome positiv beeinflussen, kann das Fortschreiten der Erkrankung zurzeit nicht aufgehalten, sondern nur hinausgezögert werden. Aus diesem Grund geht der Trend in der modernen pharmakologischen Therapieforschung weg von der rein symptomatischen in die kausale Richtung. Dabei werden diverse Prozesse von Morbus Alzheimer moduliert, wobei sich alle Ansätze bisher erst in der klinischen Prüfung befinden:

- *Calpaininhibitoren*: Calpain 1 und 2 gehören zu den kalziumionen-abhängigen Cysteinproteasen (Nixon, 2003). Sie vermitteln die A β -induzierte Freisetzung von Dynamin 1 und Tau und sind somit bei der Entstehung von neurotoxischen Tau-Fragmenten involviert. Eine Inhibition von Calpain, z.B. mittels A-705253 (Abbott Biocenter), resultiert in einer verminderten Freisetzung von Dynamin 1 und Tau (Sinjoanu et al., 2008). Ferner beugt A-705253 einer N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor vermittelten Exzitotoxizität vor (Nimmrich et al., 2008).

- *GSK 3-Inhibitoren:* Die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK 3) ist bei einer Vielzahl von physiologischen aber auch pathophysiologischen Prozessen involviert, wie z.B. der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins (Baki et al., 2004; Hanger et al., 1992; Lucas et al., 2001). In Bezug auf Morbus Alzheimer spielt GSK 3 u.a. eine Rolle beim Splicen der Tau-mRNA und bei der Generierung von A β . GSK 3 kann ferner die Funktion von Presenilin 1 verändern und die Langzeitpotenzierung im Hippocampus beeinflussen (Baki et al., 2004; Muyllaert et al., 2008). GSK 3-Inhibitoren, wie z.B. NP-12 (Noscira) sollen verbesserte kognitive Leistungen, verminderte Plaqueablagerungen und verringerten Verlust neuronaler Zellen erzielen.
- *γ -Sekretasemodulatoren:* Die γ -Sekretase ist ein Enzymkomplex, welcher bei der amyloiden APP-Spaltung von C99 in A β involviert ist (Abb. 1). Durch die Modulation der γ -Sekretase wird erhofft, dass die Produktion von A β vermindert wird ohne andere Substrate der γ -Sekretase zu beeinflussen, wie z.B. die Notch-Spaltung. Mittels der Substanz Tarenflurbil (R-Flubiprofen; Myriad Genetics) konnten in einer Phase II-Studie nur moderate kognitive Verbesserungen gezeigt werden (Wilcock et al., 2008).
- *Aggregationsinhibitoren:* Ziel ist die Blockierung der Aggregatbildung von A β indem sich z.B. Alzhemed (Tramiprosat; Neurochem) an lösliches A β bindet (Aisen et al., 2007). Dies führt zu einer Verlangsamung der A β -Aggregation und damit zu einer verringerten Neurotoxizität. Neben A β -Aggregaten können ebenso Tau-Aggregate z.B. mittels REMBER (Methylthioninium Chlorid) inhibiert werden (Murray et al., 2008). Auch hierbei ist das Ziel eine verminderte Neurotoxizität, wodurch kognitive und andere Verhaltensdefekte normalisiert werden (Wischik et al., 2008).
- *Aktive Immunisierung:* Diese Form der Immunisierung wird mit aggregierten Formen von A β_{1-42} (z.B. AN-1792; ACC-001; Elan/Wyeth) durchgeführt. Das Ziel der Immunisierung ist es, die Bildung von körpereigenen Antikörpern gegen A β zu induzieren und damit das Auftreten von Plaques im Gehirn zu vermindern bzw. die Neubildung von Plaques zu inhibieren und dadurch verbesserte kognitive Leistungen zu erzielen (Janus et al., 2000; Schenk et al., 1999). Aufgrund des Auftretens von Meningoencephalitis wurde die AN-1792 Phase IIa-Studie zunächst gestoppt (Orgogozo et al., 2003). Mit ACC-001, welches ein verbessertes Sicherheitsprofil aufweist, prüft Elan/Wyeth das Konzept jetzt erneut in einer klinischen Phase II-Studie (Pride et al., 2008).

- *Passive Immunisierung:* Die passive Immunisierung wird durch die Gabe von monoklonalen Antikörpern erzielt, die gegen allgemeine oder spezifische A β -Formen gerichtet sind. Das Ziel hierbei ist es, ebenso wie bei der aktiven Immunisierung, das Auftreten und die Neubildung von A β -Ablagerungen in amyloiden Plaques im Gehirn zu verringern bzw. zu hemmen. Da Plaques aber schlecht mit den kognitiven Symptomen korrelieren (Dodart et al., 2002; Katzman et al., 1988; Kotilinek et al., 2002; Näslund et al., 2000), zielen neuere Ansätze auf die Neutralisierung toxischer A β -Oligomere ab (Barghorn et al., 2005; Townsend et al., 2006). Erhofft wird, dass durch eine frühzeitige Immunisierung Symptome von Morbus Alzheimer vermindert bzw. insgesamt verhindert werden. Allerdings sind in präklinischen Studien Nebenwirkungen in Form von zerebralen Mikroblutungen bei alten APP transgenen Mäusen aufgetreten, sowohl beim Antikörper 3D6 (Elan/Wyeth; Racke et al., 2005) als auch beim Antikörper 2H6 (Rinat/Pfizer; Wilcock et al., 2006). Die Mikroblutungen traten dabei unabhängig vom Antikörperepitop auf, denn 3D6 bindet an die N-terminale und 2H6 an die C-terminale Sequenz von A β . Ein weiteres Ziel ist daher die Entwicklung von Antikörpern mit verbessertem Sicherheitsprofil (Ebert et al., 2008). Trotz der Mikroblutungen in APP transgenen Mäusen wurde 3D6 einer klinischen Prüfung unterzogen. Während in einer Phase I-Studie keine kortikalen Mikroblutungen in Patienten auftraten, war ein reversibles Signal im MRT nach höheren Antikörperdosen zu sehen, was auf ein vasogenes Ödem hindeutet. Dieses Signal wurde auch in der folgenden Phase II-Studie beobachtet, vor allem bei Patienten mit dem ApoE4-Allel (Grundman und Black, 2008). Ein Zusammenhang zwischen Mikroblutungen bei APP transgenen Mäusen und dem MRT-Signal für vasogene Ödeme im Menschen ist noch unklar.
- *Neuronale nikotinerge Acetylcholinrezeptoren:* Die neuronalen nikotinergen Acetylcholinrezeptoren sind ein relativ neues Feld unter den Strategien zur Behandlung von Morbus Alzheimer. Angesprochen werden dabei im Besonderen die α 4 β 2- und α 7-Rezeptoren. Zurzeit sind verschiedene Rezeptoragonisten in klinischen Studien (Phase II-Studien), wie z.B. AZD3480 (Targacept; AstraZeneca), MEM 3454 (Roche/Memory Pharmaceuticals) und GTS-21 (CoMentis; Melnikova, 2007).
- *Metallionen:* Die Biometalle Kupfer oder Zink begünstigen in ihrer ionisierten Form die A β -Aggregation und tragen somit zur Neurotoxizität bei (Bush et al., 1994; Bush et al., 1994², Tōugu et al., 2008). PBT2 (Clioquinol; Prana Biotechnology) inhibiert die durch Kupfer- bzw. Zinkionen vermittelte Oligomerisierung von A β und verhindert damit Neurotoxizität. Eine Phase IIa-Studie zeigte eine dosisabhängige Reduzierung von A β ₁₋₄₂ im

Liquor cerebrospinalis. Auch konnte eine signifikante Verbesserung kognitiver Funktionen gezeigt werden (Lannfelt et al., 2008).

1.2. Präklinische Modelle

Sowohl die Grundlagenforschung als auch die Entwicklung und Zulassung neuer Pharmakotherapien erfordern den Einsatz von prädiktiven präklinischen Modellen. Im Hinblick auf die neuropathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer steht heutzutage eine Vielfalt an Modellen zur Verfügung. Anhand von transgenen invertebraten Modellorganismen, wie z.B. *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster*, können genetische Ursachen der Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer untersucht werden (Driscoll und Gerstbrein, 2003; Hornsten et al., 2007; Kraemer et al., 2003; Miyasaka et al., 2005; Wittmann et al., 2001). Für weitergehende *in vivo* Experimente wurden vielfältige transgene Mausmodelle mit divergenten Phänotypen generiert. Das dabei abgedeckte neuropathologische Spektrum reicht von der Überexpression vom APP, über ApoE und Presenilin bis zur Überexpression und Hyperphosphorylierung vom Tau-Protein (eine Übersicht der Modelle befindet sich auf der Homepage des Alzheimerforums: <http://www.alzforum.org/res/com/tra/default.asp>). Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Promotoren, Anzahl und Expressionsstärke kann eine Insertion der gleichen humanen Mutation zu sehr unterschiedlichen Phänotypen führen. Welches transgene Modell in der präklinischen Forschung eingesetzt wird, ist von der speziellen Fragestellung abhängig.

Im Rahmen der in dieser Studie untersuchten passiven Immunisierungen wurden zwei unterschiedliche Mausmodelle mit einer Überexpression von humanen APP, aber unterschiedlichen Mutationen eingesetzt: mit der schwedischen Mutation (Tg2576) und mit der London-Mutation V717I (APP/Lo). Bei beiden ist die Ursache der Überexpression eine Mutation der humanen APP695-cDNA. Das Tg2576-Mausmodell enthält eine doppelte Mutation von Aminosäuren (KM670/671NL; Lysin⁶⁷⁰→Asparagin und Methionin⁶⁷¹→Leucin), der Promotor ist ein Hamster Prionprotein-Cosmidvektor und das mutierte humane APP wurde in C57BL/6-Mäuse kloniert (Hsiao et al., 1996; Mullan et al., 1991). Im Gegensatz dazu wurde beim APP/Lo-Mausmodell die London-Mutation V717I kloniert, der Promotor ist hierbei ein Neuronen-spezifisches murines Thy1-Gen (Goate et al., 1991; Moechars et al., 1999). Neuropathologisch charakterisiert sind beide Modelle durch eine Überexpression von APP. Diese wiederum resultiert in einer verstärkten Bildung von A β , der Ablagerung von Plaques, hauptsächlich im Kortex und Hippocampus, und in zerebrovaskulärer Amyloidangiopathie (Hsiao et al., 1996; Moechars et al., 1999; Rensink et al., 2003; VanDorpe et al., 2000; Wilcock et al., 2006). Allerdings variiert der Zeitpunkt des Auftretens der Plaques bei

beiden Tiermodellen. Während bei den Tg2576-Mäusen die Entstehung von löslichem und fibrillärem A β ab einem Alter von acht Monaten nachgewiesen werden kann (Callahan et al., 2001), werden bei APP/Lo-Mäusen die amyloiden Plaques erst ab zwölf Monaten gebildet (Moechars et al., 1999). Dagegen ist bei beiden Modellen das Auftreten von kognitiven Defiziten gegenüber Wildtyp-Mäusen ab einem Alter von ca. neun bis zehn Monaten gemeinsam.

Ungeachtet der Tatsache, dass doppelte und dreifach transgene Mausmodelle generiert wurden, deckt kein Modellorganismus das gesamte neuropathologische Spektrum von Morbus Alzheimer ab. Aus diesem Grunde muss bei tierexperimentellen Fragestellungen eine sorgfältige Auswahl des entsprechenden Tiermodells getroffen werden.

1.3. Tomographieverfahren

Im Gegensatz zu histologischen Methoden erlauben die nicht-invasiven bildgebenden Verfahren in der Klinik die Erhebung komplexer neuropathologischer Befunde. Zwei dieser klinisch häufig eingesetzten Verfahren sind die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

1.3.1. Magnetresonanztomographie

1.3.1.1. Grundlagen

Das Prinzip des MRTs beruht auf der Tatsache, dass die Atomkerne des Wasserstoffs (Protonen) einen Eigendrehimpuls (Spin) und somit die Fähigkeit zur Magnetresonanz besitzen. Werden diese Atomkerne einem statischen Magnetfeld ausgesetzt, richten sich die Spins entsprechend aus und gelangen in eine Ruhelage (Gleichgewicht). Diese Ausrichtung wird als Präzisionsbewegung bezeichnet, wobei die Spins kegelförmig um die Magnetfeldrichtung kreisen. Hierbei ist die Frequenz der Drehung (= Larmorfrequenz) abhängig vom Kerntyp und proportional zur Stärke des angelegten Magnetfeldes.

Durch das Anlegen eines Hochfrequenz-Impulses eines rotierenden Magnetfeldes, können die Spins aus der Ruhelage gelenkt werden. Die Hochfrequenz muss dabei in Resonanz mit den Spins sein, d.h. mit der Larmorfrequenz übereinstimmen. Nach dem Abschalten des Impulses kehren die Spins durch die Relaxation wieder in ihren Ursprungszustand zurück. Dabei wird elektromagnetische Strahlung mit der Larmorfrequenz freigesetzt, das Magnetresonanzsignal. Dieses kann durch eine Empfängerspule detektiert werden. Um eine dauerhafte Präzisionsbewegung der Kerne und eine dadurch bedingte Spannungs-

freisetzung zu erzielen, wird während der Tomographie ein hochfrequentes magnetisches Wechselfeld angelegt. Die dabei gemessenen einzelnen Signale werden durch verschiedene Verfahren zu einem MRT-Bild zusammengefügt.

Bei klinischen MRTs werden drei verschiedene Darstellungskontraste verwendet: Spin-Gitter-Relaxationszeit (T1), Spin-Spin-Relaxationszeit (T2) und die transversale Relaxation in Form des freien Induktionszerfalls (T2*-gewichtet).

- Der T1-Kontrast ist die Dauer der longitudinalen Relaxation, d.h. die Rückkehr der Spins in ihren Gleichgewichtszustand nach dem Abschalten des magnetischen Feldes. Dabei ist T1 als die Zeitspanne nach dem Anregungsimpuls definiert, in der 63 % der angeregten Spins in ihre Ausgangsposition zurückgekehrt sind. Die Protonenenergie wird hierbei an das Umfeld (= Gitter) abgegeben.
- Hingegen ist der T2-Kontrast die Dauer der transversalen Relaxation. Dabei ist T2 als die Zeitspanne nach dem Anregungsimpuls definiert, in der durch Dephasierung die Quermagnetisierung zu 63 % verloren gegangen ist. Die Protonenenergie wird bei T2, im Gegensatz zu T1, nicht an das Umfeld sondern an andere Spins abgegeben.
- Der T2*-gewichtete Kontrast ist die Dauer einer transversalen Relaxation in Form des freien Induktionszerfalls. Der T2*-gewichtete Kontrast wird dabei durch die Spin-Spin-Relaxationszeit und durch lokale Magnetfeldinhomogenitäten bestimmt. Diese Magnetfeldinhomogenitäten erlauben eine kürzere Relaxation im Unterschied zum T2-gewichteten Kontrast, welcher nur in einem homogenen Magnetfeld gemessen werden kann. Ferner erlaubt die Gradientenechosequenz (FLASH) beim T2*-gewichteten Kontrast durch kleine Auslenkungswinkel sehr kurze Repetitions- und Echozeiten, wodurch eine schnellere Bildaufnahme ermöglicht wird.

Unterschiedliche Gewebe besitzen eine ungleiche Protonendichte, wodurch variable Signalintensitäten bei Messung von T1 und T2 erzeugt werden (Tab. 2; Rinck und Zink, 2005).

Substanz	T1	T2
Wasser	Dunkel	Hell
Fett	Hell	Mittel bis Hell
Knochen	Dunkel	Dunkel
Fibröses Gewebe	Dunkel	Dunkel
Desoxihämoglobin	Mittel bis Dunkel	Dunkel
Methämoglobin		
-intrazellulär	Mittel bis Hell	Dunkel
-extrazellulär	Hell	Hell
Hämosiderin	Mittel bis Dunkel	Dunkel
Gadolinium	Hell	Mittel

Tab. 2. Darstellung von verschiedenen Geweben/Substanzen im MRT mittels T1- und T2-Kontrast

1.3.1.2. Einsatzmöglichkeiten

Ein Vorteil des MRTs gegenüber anderen bildgebenden Verfahren ist ein hervorragender Weichteilkontrast ohne zusätzliche Kontrastmittelgabe. Daher eignet sich das MRT zur anatomischen Darstellung von Gehirnstrukturen oder die Wiedergabe von physiologischen Veränderungen mittels funktionellem MRT. Das funktionelle MRT kann z.B. zur Messung des BOLD-Effekts (Blood Oxygen Level Dependent) verwendet werden. Durch den Austausch von Sauerstoff gegen Kohlendioxid beim Hämoglobin, wird paramagnetisches Deoxyhämoglobin gebildet. Wird ein paramagnetischer Stoff in ein magnetisches Feld gebracht, wird er selbst zum Magneten und erzeugt dadurch Magnetfeldinhomogenitäten (Nighoghossian et al., 2002; Rinck und Zink, 2005). Diese Magnetfeldinhomogenitäten wiederum weisen im MRT-Bild eine geringere Signalintensität als das umgebende Gewebe auf und sind dadurch als hypointenses Signal erkennbar.

Standard bei klinischen MRTs sind gegenwärtig Geräte mit einer Magnetstärke von 1-3 Tesla. Diese Geräte sind leistungsstark genug, um mittels T2*-gewichtetem Kontrast zerebrale Mikroblutungen beim Menschen feststellen zu können. Diese Mikroblutungen können bei Morbus Alzheimer-Patienten mit zerebraler amyloider Angiopathie, bei Schlaganfallpatienten oder bei anderen zerebralen Erkrankungen detektiert werden (Atlas et al., 1988; Cordonnier et al., 2007; Hanyu et al., 2003; Nakata et al., 2002; Nighoghossian et al., 2002; Viswanathan und Chabriat, 2006). Eine weitere Einsatzmöglichkeit des MRTs bei Morbus Alzheimer ist die Beobachtung der Atrophie von kortikalen oder hippocampalen Regionen (Mori et al., 2002). Mit zunehmendem Fortschreiten der Erkrankung verringert sich das Gehirnvolumen, wodurch eine Erweiterung der zerebralen Ventrikel auftritt, was ebenfalls mittels MRT dargestellt werden kann (Cummings, 2004; DeLeon et al., 2007; Jack et al., 2008).

Mit der Entwicklung von leistungsfähigeren MRT-Magneten (sieben Tesla und mehr) sind die Voraussetzungen für die Darstellung von zerebralen Strukturen bei kleinen Nagetieren geschaffen worden. Die Schwierigkeiten bei der Tomographie von Nagetieren sind in den kleinen Gehirnvolumina begründet. Es wird daher für die Darstellung von zerebralen Strukturen eine hohe räumliche Auflösung benötigt. Diese gesteigerte Auflösung kann durch eine lange Untersuchungsdauer oder durch leistungsstärkere MRT-Geräte erzielt werden. Mit Hilfe eines solchen Gerätes können diverse neurologische Fragestellungen bei Morbus Alzheimer in Tiermodellen geklärt werden. So können an transgenen Tieren morphologische bzw. volumetrische Abnormalitäten im Hippocampus, Kortex, Hirnstamm, Cerebellum und an den Ventrikeln nachgewiesen werden (Lau et al., 2008). Ferner wurden Versuche zum Nachweis von amyloiden Plaques bei transgenen Mäusen mittels MRT unternommen (El Tannir El Tayara et al., 2006; Jack et al., 2004; Higuchi et al., 2005; Poduslo et al., 2002). Des Weiteren kann die MRT zur Messung von zerebralen hämodynamischen Prozessen bei Tieren verwendet werden (Hooijmans et al., 2008; Marota et al., 1999; Mueggler et al., 2003). Die immer weiter fortschreitende Entwicklung der MRT-Technik eröffnet hinsichtlich der präklinischen Grundlagenforschung bei Morbus Alzheimer stetig neue Verwendungsmöglichkeiten.

1.3.2. Positronen-Emissions-Tomographie

1.3.2.1. *Grundlagen*

Das Grundprinzip des PET beruht auf dem Zerfall von Radionukliden im Organismus, wobei instabile Mutterisotope in einen stabilen Zustand übergehen. Bei diesem Prozess werden Positronen emittiert. Tritt nun ein emittiertes Positron in Wechselwirkung mit einem Elektron entstehen zwei hochenergetische Photonen, welche in einem Winkel von 180° zueinander ausgesandt werden. Diese ausgesandten Photonen werden von zwei gegenüberliegenden Detektoren in Form von Koinzidenzen registriert. Durch die ringförmige Anordnung der Detektoren, kann aus der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Koinzidenzen Rückschlüsse auf die Verteilung eines Radioligands gezogen werden. Mit Hilfe von mathematischen Rekonstruktionen werden anschließend graphische Darstellungen erzeugt.

Entsprechend der Fragestellung und der Leistungsfähigkeit des PET-Gerätes werden die Radionuklide ausgewählt. Ein häufig eingesetztes Radionuklid ist ^{18}F (Fluor-18), da es eine relativ lange Halbwertszeit von 110 Minuten hat. Im Gegensatz zum ^{18}F haben die restlichen Nuklide eine kürzere Halbwertszeit (Tab. 3) und erfordern somit ein Zyklotron zur Herstellung des Radioliganden in unmittelbarer Nähe des PET-Systems.

Radionuklide	Halbwertszeiten
¹¹ Kohlenstoff	20,3 min
¹³ Stickstoff	10,1 min
¹⁵ Sauerstoff	2,03 min
¹⁸ Fluor	110 min
⁶⁸ Gallium	68 min
⁸² Rubidium	75 sec

Tab. 3. Halbwertszeiten der Radionuklide für das PET

Die Nuklide werden mit verschiedenen Substanzen zu einem Radioligand verbunden, so dass verschiedene stoffwechselbedingte Aspekte untersucht werden können. Ein Beispiel für einen Radioliganden ist ¹⁸FDG (2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose). Mit Hilfe von ¹⁸FDG kann der Glukosestoffwechsel regional gemessen werden. ¹⁸FDG ist ein Glukose-Analagon bei dem eine Hydroxylgruppe gegen ein ¹⁸Fluormolekül ausgetauscht wurde. Es wird wie Glukose über die Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen und dort phosphoryliert. Die Dephosphorylierung des entstandenen FDG-6-Phosphats geschieht aufgrund des ¹⁸F-Austausches deutlich langsamer. Dadurch wird in den Zellen FDG-6-Phosphat akkumuliert, was mittels PET gemessen wird.

1.3.2.2. Entwicklungen

Obwohl PET eine hochsensitive Methode zur Untersuchung von Stoffwechselaktivitäten ist, hat es zwei gravierende Nachteile. Zum einen lassen sich in PET-Bildern die Aktivitätsanreicherungen anatomisch nicht gut lokalisieren und zum anderen besitzt PET nur ein begrenztes räumliches Auflösungsvermögen. Um diese Nachteile zu umgehen, wurde eine Kombination aus einem PET-Scanner und einem Röntgencomputertomographen (CT) entwickelt, das PET/CT-System. Bei diesem kombinierten System befinden sich PET und CT in einem Gerät, so dass die Tomographien unmittelbar hintereinander durchgeführt werden können. Der Vorteil eines kombinierten Gerätes ist eine gleichbleibende Lagerung des Probanden/Versuchstieres während der Untersuchung mit CT und PET, da hierbei nur die axiale Position des Bettes verändert wird. Beim CT werden, im Gegensatz zum PET, Röntgenbilder aus unterschiedlichen Richtungen erstellt und mit Hilfe dieser Einzelbilder 3D-Rekonstruktionen berechnet. Diese 3D-Rekonstruktionen dienen anschließend als anatomischer Hintergrund bei der Fusionierung der CT- und PET-Bilder.

Eine weitere Kombinationsmöglichkeit ist die Verknüpfung vom PET und MRT. Durch die simultane Messung von MRT und PET werden die Vorteile des MRTs, insbesondere hohe Auflösungsrate und guter Weichteilkontrast, und die Messung der Stoffwechselaktivität mit der hohen Empfindlichkeit des PET verbunden. Dazu mussten Modifikationen des PET-Detektors vorgenommen werden. Die bis dahin verwendeten Detektoren wurden im

magnetischen Feld zerstört (Schwaiger et al., 2005). Erst durch die Entwicklung von Lawinen-Photodioden (Avalanche Photodiodes) wurde dieses Problem gelöst (Schwaiger et al., 2005). Im Jahre 2007 wurde ein PET/MRT-Gerät mit diesen Dioden in Betrieb genommen. Dieses Gerät kann für die neuropathologische Diagnostik, z.B. des verringerten Hirnvolumens, oder für eine bessere Abgrenzung der leichten kognitiven Störung gegenüber Morbus Alzheimer eingesetzt werden (Aschenbrenner, 2007).

Um neuropathologische Merkmale in Maus- und Rattenmodellen *in vivo* studieren zu können, wurden in den 90er Jahren mikroPETs entwickelt. Mit diesen Kleintier-PETs werden die kleineren Gehirnstrukturen bei Mäusen qualitativ ähnlich dargestellt wie bei klinischen PET-Untersuchungen. Ein Grundstein für die erforderliche hohe Sensitivität war die Entwicklung der aus Lutetium-Oxyorthosilikat-Kristallen bestehenden Detektoren (Myers und Hume, 2002). Durch eine hohe Anzahl und eine ringförmige Anordnung dieser Detektoren wurde die Sensitivität weiter verbessert. Um das begrenzte Injektionsvolumen bei Tieren zu kompensieren und die Empfindlichkeit des PETs zu steigern, werden beim mikroPET Radioliganden mit einer sehr hohen Radioaktivität verwendet. Des Weiteren tragen die Verbesserungen der mathematischen Rekonstruktionen bei der Erstellung der PET-Bilder ebenfalls zur verbesserten Sensitivität bei.

1.3.2.3. Einsatzmöglichkeiten

In der neurologischen Forschung wird das PET zur Messung von Stoffwechselprozessen, Signalübertragungen, Rezeptorprozessen und zerebralen Aktivierungen eingesetzt. Ein Anwendungsgebiet bei Morbus Alzheimer ist die Untersuchung des zerebralen Glukosestoffwechsels mittels ^{18}F FDG. Hierbei wird die ^{18}F FDG-Aktivität als ein Maß für neuronale bzw. synaptische Aktivität betrachtet, da Glukose als einzige Ressource für die Energiebereitstellung bei Zellen gilt (Jueptner und Weiller, 1995; Sokoloff, 1978; Sokoloff, 1981). Morbus Alzheimer-Patienten und transgene Tiere mit einer Überexpression von APP weisen regional eine progressive Verminderung der ^{18}F FDG-Aufnahme bzw. des zerebralen Glukosemetabolismus auf (Herholz, 2003; McGeer et al., 1986; Mielke et al., 1994; Reiman et al., 1996; Valla et al., 2002). Dieser Hypometabolismus tritt verstärkt im temporoparietalen, frontalen, posterior und cingulatem Kortex auf (Alexander et al., 2002; Reiman et al., 1996; Hatashita et al., 2008). Der verminderte Stoffwechsel konnte mit einigen Verhaltensdefiziten bzw. mit dem Demenzgrad der Morbus Alzheimer-Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden (Edison et al., 2007; Minoshima et al., 1997; Reiman et al., 1996).

Eine weitere Einsatzmöglichkeit vom PET ist die *in vivo* Untersuchung des fibrillären A β mittels des Radioliganden ^{11}C -Pittsburgh Compound-B (PIB = N-methyl-2-(4'-methylamino-phenyl)-6-hydroxybenzothiazole). Das Thioflavin-T-Derivat PIB kann aufgrund seiner kleinen Molekülstruktur die Blut-Hirn-Schranke durchdringen. Ferner besitzt PIB eine hohe Bindungsaffinität an die β -Faltblattstruktur des amyloiden Proteins (Klunk et al., 2004; Mathis et al., 2002). Diese Sensitivität des PIB konnte mittels histologischer und biochemischer Methoden verifiziert werden (Ikonovic et al., 2008). PET-Untersuchungen mit Hilfe von PIB können für den *in vivo* Nachweis von Arealen mit erhöhter Plaquedichte, wie z.B. dem temporo-parietalen, frontalen oder posterior cingulaten Kortex, verwendet werden (Hatashita et al., 2008; Nordberg, 2007). Oder sie werden zum Nachweis einer verminderten Plaquedichte nach einer passiven Immunisierung eingesetzt (Maeda et al., 2007). Allerdings ist die Verwendung von ^{11}C -PIB aufgrund der geringen Halbwertszeit vom Kohlenstoff (20,3 Minuten) stark limitiert. Die Bestrebungen in der Entwicklung gehen deshalb in Richtung Radioliganden mit längerer Halbwertszeit, indes weisen die bisherigen neuen Radioliganden eine geringere Sensitivität als PIB auf.

Die fortlaufende Verbesserung des Auflösungsvermögens beim PET und die stetige Entwicklung neuer spezifischer Radioliganden eröffnen der präklinischen Grundlagenforschung bei Morbus Alzheimer stetig neue Einsatz- und Verwendungsmöglichkeiten, wie z.B. der Nachweis aktivierter Mikroglia mittels ^{18}F -Fluorethyl-DAA1106 (Maeda et al., 2007).

1.4. Zielsetzung

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung mit einer hohen Prävalenz. Die Alzheimer'sche Krankheit kann bis heute nicht geheilt werden, da die zur Verfügung stehenden symptomatischen pharmakologischen Behandlungsmethoden ein Fortschreiten der Erkrankung nicht aufhalten können. Aus diesem Grunde ist die Untersuchung der exakten neuropathologischen Grundlagen und den daraus resultierenden Möglichkeiten zur Entwicklung neuer kausaler Wirksubstanzen ein wichtiges Ziel. Voraussetzung für die klinische Zulassung von neuen Substanzen sind umfassende präklinische Studien.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll tierexperimentell untersucht werden, ob der Einsatz von Tomographieverfahren bei Versuchstieren als prädiktives Modell zur Darstellung neuropathologischer Marker bei Morbus Alzheimer geeignet ist. Wichtige neuropathologische Merkmale wie das Auftreten von amyloiden Plaques, neurofibrillären Bündeln, Gehirnatrophien oder der Verlust von Neuronen werden im Verlauf präklinischer Studien mittels vielfältiger histologischer Färbungen untersucht. In der Klinik werden vor

allem Tomographieverfahren, wie z.B. MRT oder PET, zur Diagnose von Morbus Alzheimer eingesetzt (Cummings, 2004; Knopman et al., 2001; Silverman et al., 2001). Auch in der tierexperimentellen Grundlagenforschung hat sich der Einsatz dieser Verfahren in den letzten Jahren ausgeweitet. Inwieweit diese Techniken für den Einsatz bei präklinischen Studien geeignet sind, soll anhand dieser Arbeit untersucht werden. Aufgrund vorausgegangener Untersuchungen wird erwartet, dass die Ergebnisse des Einsatzes von Tomographieverfahren ebenso korrekt wie herkömmliche histologische Methoden sind und dass die nicht-invasiven Untersuchungen mehrmals im selben Tier und vor allem schneller durchgeführt werden können.

Ein innovativer Ansatz der Morbus Alzheimer-Therapie ist die Entwicklung einer gegen A β gerichteten Immunisierung. Das Ziel dieser Behandlung ist eine Verminderung der amyloiden Plaques und daraus resultierend eine Verbesserung der kognitiven Leistungen (Bard et al., 2000; DeMattos et al., 2001; Dodart et al., 2002; Wilcock et al., 2004). Bisher traten bei der passiven Immunisierung gegen A β Nebenwirkungen in Form von zerebralen Mikroblutungen und/oder zerebralen Angiopathien auf (Pfeifer et al., 2002; Racke et al., 2005; Wilcock et al., 2006; Wilcock et al., 2007). Der Nachweis der Mikroblutungen erfolgt in der Regel *ex vivo* durch eine Preußisch-Blau-Färbung mit einer anschließenden Indexbestimmung (Racke et al., 2005). Aufgrund des hohen Zeitbedarfs bei der Färbung bzw. Auswertung soll anhand dieser Arbeit untersucht werden, ob ein *in vivo* Nachweis von Mikroblutungen mittels MRT im Rahmen einer präklinischen Studie äquivalent zur histologischen Färbung sein kann. Mittels T2*-gewichtetem MRT ist es möglich Deoxyhämoglobin als hypointenses Signal darzustellen. Grundlage hierfür sind die durch das paramagnetische Deoxyhämoglobin produzierten Magnetfeldinhomogenitäten, welche zu einer schnellen Dephasierung der Protonen im T2*-gewichteten MRT führen (Nighoghossian et al., 2002). Aus diesem Grunde wird ein exakter Nachweis der Mikroblutungen mittels T2*-gewichtetem MRT erwartet.

Ferner soll anhand dieser Arbeit das eigentliche Ziel einer passiven Immunisierung, die Reduktion der amyloiden Plaques mittels MRT überprüft werden. Da die verwendeten Antikörper entweder gegen die N-terminale oder gegen eine zentrale Sequenz von A β gerichtet sind, wird eine Abnahme von amyloiden Plaques erwartet. Basierend auf den Ergebnissen anderer Gruppen wird eine *in vivo* Untersuchung ohne Kontrastmittel bzw. mit FSB ((E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)stryrylbenzen) als Kontrastmittel als möglich angesehen (Jack et al., 2004; Higuchi et al., 2005). Erwartet werden weiterhin vergleichbare Ergebnisse der *in vivo* MRT-Untersuchung mit dem histologischem *ex vivo* Nachweis.

Das MRT ist für die molekulare Bildgebung bei kleinen Versuchstieren nur eingeschränkt geeignet. Aus diesem Grunde wurde für einen weiteren Aspekt der Arbeit, die Beeinflussbarkeit des Metabolismus von transgenen Mäusen im Rahmen einer passiven Immunisierung, das PET-Verfahren verwendet. Es ist bekannt, dass Morbus Alzheimer-Patienten einen verminderten Glukosemetabolismus in degenerierten Arealen aufweisen (Herholz, 2003; McGeer et al., 1986). Ob dieser veränderte Glukosemetabolismus bei transgenen Mäusen ebenfalls auftritt und pharmakologisch behandelt werden kann, soll in einem weiteren Experiment mittels PET untersucht werden. Abschließend werden die Ergebnisse histologisch verifiziert.

Aus diesen Zielen ergeben sich folgende Fragestellungen, die mit dieser Arbeit geklärt wurden:

1. Können Blutablagerungen mittels MRT hoch aufgelöst werden? Kann deren Auftreten und Größe im MRT mit histologischen Methoden verifiziert werden?
2. Können Mikroblutungen als unerwünschte Wirkung einer chronischen A β -Immunisierung in APP transgenen Mäusen im MRT *in vivo* nachgewiesen werden? Kann die Entstehung von Mikroblutungen im Laufe einer Studie *in vivo* überwacht werden? Können die MRT-Daten histologisch verifiziert werden?
3. Können amyloide Plaques im Rahmen einer passiven A β -Immunisierung in APP transgenen Mäusen mittels MRT *in vivo* detektiert und deren Zahl, Größe und Entstehung analysiert werden?
4. Kann bei APP transgenen Mäusen ein erhöhter Glukosestoffwechsel *in vivo* mittels PET nachgewiesen und eine Veränderung im Rahmen einer chronischen A β -Immunisierung gezeigt werden? Kann ein veränderter Glukosestoffwechsel in APP transgenen Mäusen histologisch verifiziert werden?

Durch die Beantwortung der einzelnen Fragestellungen soll untersucht werden, ob die Tomographieverfahren MRT und PET adäquate Methoden im Hinblick auf Untersuchungen in präklinischen Studien mit APP transgenen Mäusen als Modell für Morbus Alzheimer sind.

2. Material und Methoden

2.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen mittels MRT

Bei diesem Versuch wurde untersucht, ob und in welcher Quantität Blutablagerungen im Rattengehirn mittels Magnetresonanztomographie (MRT) nachgewiesen werden können. Anschließend wurden die MRT-Ergebnisse mit einer herkömmlichen histologischen Methode verifiziert.

2.1.1. Versuchstiere

Für den Versuch wurden vierzehn männliche ca. vier Monate alte Sprague-Dawley-Ratten (200-320 g) vom Versuchstierzüchter Charles Rivers Laboratories (USA) verwendet. Die Ratten hatten eine einwöchige Akklimatisierungsphase, um sich an folgende Bedingungen im Tierstall zu gewöhnen: Temperatur 20-22 °C; Luftfeuchtigkeit 40-70 %; geregelter 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus (Hellphase von 6:00 bis 18:00 Uhr). Wasser und Standardfutter (Harlan Global Diet 20018; USA) standen ad libitum zur Verfügung. Die Ratten wurden während des Experimentes einzeln gehalten, wobei die Käfige durch die Zugabe von Nagehölzern angereichert waren.

Der tierexperimentelle Teil der Studie wurde in Abbott Park (Illinois, USA) in AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care) zertifizierten Laboratorien durchgeführt. Es lag eine Genehmigung gemäß den amerikanischen Richtlinien des IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee; Abbott; USA) vor.

2.1.2. Operativer Eingriff

In elf Ratten wurde arterielles Blut in den Kortex injiziert, welches aus drei anderen Ratten gewonnen wurde. Zur Vorbereitung der Mikroinjektion wurden die Ratten mit einer Mixtur aus Medetomidin (0,5 mg/kg KG; Orion Corporation; Finnland) und Ketamin (75 mg/kg KG; Fort Dodge; USA) i.p. anästhesiert. Nach dem Erreichen der operativen Narkosetiefe, gekennzeichnet durch den Verlust des Zwischenzeh- und des Kornealreflexes, wurde bei einer blutspendenden Ratte die Arteria femoralis freigelegt und in diese ein spitz ausgezogener Polyethylenschlauch (PE-50; Becton Dickinson; USA) eingebunden. Über diesen Katheter erfolgte die arterielle Blutentnahme. Um die pathologischen Bedingungen einer zerebralen amyloiden Angiopathie nachzustellen, welche hauptsächlich in Arterien bzw. in Arteriolen auftritt (Kalara, 2002; Rensink et al., 2003), wurde frisches arterielles sauerstoffreiches Blut intrazerebral in Ratten injiziert.

Einem Spendertier konnte mehrmalig Blut entnommen werden und dieses für mehrere Empfängertiere genutzt werden.

Nach der Anästhesierung wurde den Versuchstieren (Empfängertiere) zunächst die Kopfbehaarung entfernt. Darauf folgend wurden die Ratten zur genauen Positionierung in einem stereotaktischen Apparat (Stölting; USA) fixiert. Die Oberkieferhaltung des stereotaktischen Apparates wurde so eingestellt, dass eine waagerechte Schädeloberfläche erzielt wurde und Bregma und Lambda sich in einer Ebene befanden. Nach der Inzision der Kopfhaut in rostro-kaudaler Richtung und der Entfernung des Periosts wurde die Schädeloberfläche gesäubert und getrocknet, so dass anhand des stereotaktischen Atlases (Paxinos und Watson, 1998) die Koordinaten der Injektionsstellen (Tab. 4) lokalisiert werden konnten.

Sprague-Dawley-Ratten	rostro-kaudal [mm]	lateral [mm]	ventral [mm]
linke Hemisphäre	2	-1	2,5
rechte Hemisphäre	3	1	2,5

Tab. 4. Koordinaten in mm zu Bregma für die Injektionsstellen (Paxinos und Watson, 1998)

Im nächsten Schritt wurde der Schädel an den markierten Koordinaten bis zur Dura mater geöffnet. Die Dura mater blieb dabei intakt, wodurch eine saubere Injektion gewährleistet wurde. Nun wurde das zur Injektion benötigte arterielle Blut über den Katheter des Spendetiers entnommen und mittels einer 0,5 µl-Hamiltonspritze (Hamilton Company; USA) aufgezogen. Unmittelbar danach wurde die Hamiltonspritze über der Dura mater positioniert und entsprechend der Koordinaten abgesenkt. Das aufgezogene Blut wurde langsam in das Empfängertier injiziert. Die Hamiltonspritze verblieb fünf Minuten in dieser Position. Abschließend wurde die Spritze entfernt und die Haut über dem Schädel wieder vernäht.

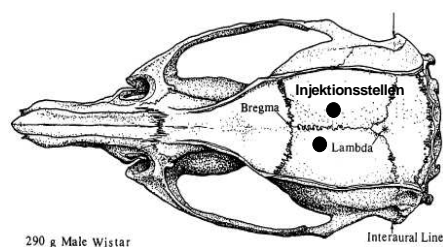


Abb. 2. Schädel einer Ratte nach Paxinos und Watson (1998)

Um die Anzahl der benötigten Ratten möglichst gering zu halten, wurde die Injektion in beide Hemisphären durchgeführt. Insgesamt wurden dabei vier unterschiedliche Volumina: 0,05 µl; 0,1 µl; 0,3 µl und 0,5 µl in elf Sprague-Dawley-Ratten appliziert (Tab. 5).

	linke Hemisphäre [μ l]	rechte Hemisphäre [μ l]
Ratte 1	0,5	0,1
Ratte 2	0,3	0,1
Ratte 3	0,05	0,3
Ratte 4	0,3	0,5
Ratte 5	0,1	0,5
Ratte 6	0,1	0,3
Ratte 7	0,1	0,3
Ratte 8	0,5	0,05
Ratte 9	0,05	0,1
Ratte 10	0,1	0,5
Ratte 11	0,05	0,05

Tab. 5. Applikationsschema bei der Injektion von arteriellem Blut in den Kortex

Die Narkosetiefe wurde anhand des Verlustes des Zwischenzeh- und des Kornealreflexes mehrfach überprüft und gegebenenfalls wurde ein weiterer Bolus der Anästhetika-Mischung i.p. verabreicht. Unmittelbar nach den operativen Eingriffen wurde eine Magnetresonanztomographie zur Qualitätsüberprüfung der Injektionen durchgeführt.

2.1.3. Magnetresonanztomographie

MRT gehört zu den bildgebenden Verfahren, welche zur Detektion von Mikroblutungen bei klinischen Studien eingesetzt werden können (Nighoghossian et al., 2002). Der für diese Arbeit verwendete Tomograph war ein spezielles MRT-Gerät für die Untersuchung kleiner Nagetiere, ein Spektrometer von Bruker mit einem 7,0 T Magneten, einer horizontalen Bohrung mit 21 cm Durchmesser und einer Paravision-Konsole (beides: Bruker BioSpin; Deutschland; Abb. 3).



Abb. 3. Bruker BioSpin MRT (Quelle: <http://www.bruker-biospin.com/mri.html>)

Vor dem Beginn der Tomographie wurden die anästhesierten Ratten in einem Kopfhalter (InsightMRI; USA) positioniert und fixiert. Dies erfolgte über einen Halter für die Schneidezähne und über Ohrbalken. Im Kopfhalter war direkt über der Schädelposition der Ratte eine Empfangsspule (Abb. 4 A; InsightMRI; USA) integriert, welche dem Empfang der Magnetresonanzsignale diente. Anschließend wurden die Tiere zusammen mit dem Kopfhalter in eine Körperröhre (Abb. 4 B; InsightMRI; USA) entsprechend ihrer Größe überführt. Dadurch wurden reflexartige Muskelbewegungen verhindert bzw. minimiert. Die absolute Ruhigstellung und richtige Positionierung, sowohl des Kopfes als auch des Rumpfes, sind ausschlaggebende Kriterien für die Qualität der Ergebnisse der MRT-

Untersuchung. Als letzter Schritt wurde die Körperröhre in eine Sendespule (Abb. 4 C; InsightMRI; USA) eingeführt und mit dieser zusammen im MRT platziert. Die Sendespule ist verantwortlich für die Generierung des hochfrequenten Impulses, welches die Spins in einen angeregten Zustand versetzt.

Eine Besonderheit der Empfangsspule von InsightMRI ist die abgerundete Oberfläche wodurch nicht nur den Kortex, sondern auch tiefer liegende Areale optimal dargestellt werden können.

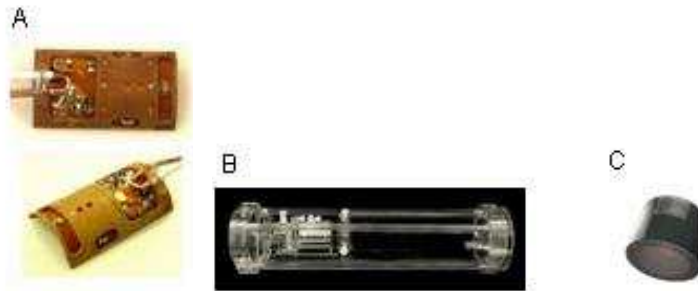


Abb. 4. A: Empfangsspule; B: Halter für Ratten; C: Sendespule von InsightMRI
(Quelle: <http://www.insightmri.com/>)

Für die Tomographie wurden zwei verschiedene Darstellungskontraste benutzt: Spin-Spin-Relaxationszeit (T2) und T2*-gewichtet. Dazu wurden folgende MRT-Parameter verwendet: **(T2)** Turbo-Spinechoresequenzen (RARE); **(T2*)** 3D-Gradientenechoresequenz (FLASH). Die weiteren Parameter sind in Tab. 6 aufgelistet. Die Tomographien wurden in transversaler Richtung durchgeführt.

Parameter	T2	T2*
Repetitionszeit [ms]	3000	100
Echozeit [ms]	50	13
Wiederholungen	4	4
Bandbreite [Hz]	5400	22000
Messfeld (FOV) [mm ³]	25,6 x 25,6 x 0,64	25,6 x 25,6 x 0,64
Bildmatrix	256 x 256 x 16	256 x 256 x 16
Bildaufnahmezeit [min]	06:24	27:18
Schnittdicke [µm]	1000	400
Anzahl der Schnitte	8	16
Auflösung in der gleichen Ebene [µm ²]	100 x 100	100 x 100
RARE-Faktor	8	

Tab. 6. Darstellung der MRT-Parameter für die T2 und T2*-gewichteten Kontraste

Nach der MRT-Untersuchung wurde den Ratten ein Antidot (Antisedan[®]; Orion Corporation; Finnland) zum raschen Erwachen appliziert und sie wurden postoperativ versorgt. Nach einer 14-tägigen Erholungsphase, in der das injizierte Hämoglobin zu Hämosiderin abgebaut wurde, fand nochmals ein finales MRT mit den gleichen Parametern statt.

2.1.4. Histologie

Sofort nach der Durchführung der finalen MRT-Untersuchung wurden die Sprague-Dawley-Ratten perfusionsfixiert. Dazu wurde den Tieren eine Überdosis des Medetomidin- und Ketaminmixes (2.1.2) verabreicht. Die Perfusionsfixierung erfolgte mittels phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und einer anschließenden Fixierung mit 10 % neutralgepuffertem Formalin (Harleco; USA) verabreicht mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Cole-Parmer Instrument Co.; USA). Danach wurden die Gehirne entnommen, 24 Stunden in 10 % neutralgepuffertem Formalin postfixiert und hinterher für mindestens zwei Tage in 30 % Sucrose inkubiert. Anschließend wurden die Gehirne mit einem Gefriermikrotom (Reichert Jung 1206; Deutschland) wie folgt geschnitten: transversal, Schnittdicke von 60 μm und rostro-kaudal im Bereich von ca. 0,8 mm vor bis 4,52 mm nach Bregma (Paxinos und Watson, 1998).

Die histologische Verifizierung der hypointensen MRT-Signale erfolgte mittels der Preußisch-Blau-Färbung nach Perls (1876). Obwohl diese Methode allgemein als Eisenfärbung gilt, wird hierbei eigentlich nicht Eisen sondern Hämosiderin nachgewiesen. Hämosiderin ist ein unlöslicher Proteinkomplex, welcher unter anderem aus dreiwertigem Eisen besteht. Dieses dreiwertige Eisen wird durch eine Mixtur aus 2 % Kalium-Ferrocyanid II (Sigma-Aldrich; Deutschland) und 1 % konzentrierter Salzsäure nachgewiesen. Nach einer 30-minütigen Inkubation in dieser Mixtur und einer gründlichen Spülung erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte für 5 Minuten mit Neutralrot (FD Neuro Technologies; USA). Nach finalen Spülgängen und Dehydratation konnten die Schnitte eingedeckt werden (X-Tra-Solv[®]; Medite; Deutschland und Ultra Kitt[®]; J.T.Baker; Niederlande). Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mittels eines Axioplan2-Mikroskops (Carl Zeiss; Deutschland) und der Neurolucida-Software (MicroBrightField; USA).

2.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer A β -Antikörperbehandlung

Das Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Feng Luo, Terese R. Seifert und Dr. Gerard B. Fox (Arbeitsgruppe Experimental Imaging, Advanced Technology, Global Pharmaceutical Discovery; Abbott Park; Illinois, USA) durchgeführt. Das Ziel war der Nachweis von Mikroblutungen, welche durch eine Amyloid-beta-Peptid (A β) Antikörperbehandlung bei transgenen Mäusen auftreten können. Dabei soll der Nachweis zum einen mittels MRT und zum anderen durch histologische Kontrolle erfolgen.

2.2.1. Versuchstiere

Für den *in vivo* und *ex vivo* Vergleich der Mikroblutungen wurden 30 transgene Mäuse beiderlei Geschlechts, die humanes Amyloid-Precursor-Protein (APP) mit der schwedischen Mutation (Tg2576) überexprimieren, und eine männliche Wildtyp-Maus (Wt) verwendet (Hsiao et al., 1996). Alle Mäuse stammten vom Versuchstierzüchter Taconic Farms Inc. (USA). Zu Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 19 und 21 Monate alt und das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug 20-25 g. Die Wildtyp-Maus war 30 Monate alt. Während des Versuchs wurden alle Mäuse in Zweiergruppen gehalten. Wasser und Standardfutter (Harlan Global Diet 20018Sx; USA) standen ad libitum zur Verfügung. Eine Anreicherung der Umgebung erfolgte durch die Zugabe von Nestlets (Ancare Corporation; USA). Die sonstigen Haltungsbedingungen und Genehmigungen entsprechen denen in Kapitel 2.1.

2.2.2. Nachweis von Mikroblutungen mittels MRT und Histologie

Die 30 Tiere wurden randomisiert in drei Gruppen unterteilt. Zwei Gruppen wurden mit dem spezifischen anti-A β ₁₋₄₂ (8F5) bzw. mit dem unspezifischen anti-A β ₁₋₄₂ (6G1) monoklonalen Antikörper behandelt (Barghorn et al., 2005). Die dritte Gruppe war die Kontrollgruppe und bekam phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) appliziert. Zusätzlich zu den drei Gruppen wurde eine Wildtyp-Maus ebenfalls mit dem 6G1-Antikörper behandelt und neben den drei Gruppen mitgeführt. Die Behandlung erfolgte i.p. einmal pro Woche und erstreckte sich insgesamt über einen Zeitraum von zwölf Wochen. Die Dosis betrug 0,5 mg pro Applikation. Die beiden Antikörper sind Produkte von Abbott Biocenter (USA).

2.2.2.1. Magnetresonanztomographie

Vor Versuchsbeginn wurde an allen Mäusen ein Basis-MRT durchgeführt, um schon existierende altersbedingte Mikroblutungen zu ermitteln. Nach diesem Basis-MRT wurde den Mäusen ein Antidot (Antisedan®; Orion Corporation; Finnland) zum raschen Erwachen appliziert. Anschließend erfolgte die dreimonatige Behandlung. Nach dem Abschluss der Behandlung wurde wiederum an allen Mäusen ein finales MRT durchgeführt. Zur Abklärung ob eine Perfusion das MRT-Ergebnis beeinflussen kann, wurde das finale MRT zweimal durchgeführt, sowohl *in vivo* als auch *ex vivo*: dem finalen *in vivo* MRT folgte eine Perfusionsfixierung ohne Gehirnextraktion. Das perfusionsfixierte Tier wurde einem *ex vivo* MRT unterzogen, danach wurde das Gehirn entnommen und postfixiert.

Für dieses Experiment wurde das gleiche 7.0 T Spektrometer von Bruker und die gleichen Empfangs- und Sendespulen wie bei Versuch 2.1.3 verwendet.

Für die MRT-Untersuchung wurden die Mäuse mit einer Mischung aus Medetomidin (1 mg/kg KG) und Ketamin (75 mg/kg KG) i.p. anästhesiert. Die Positionierung und Fixierung der Mäuse erfolgte aufgrund der geringeren Körpergröße in abgewandelter Form zu Versuch 2.1.3. Es wurde ein Halter verwendet, der speziell für kleine Nagetiere entwickelt wurde (InsightMRI; USA). Dieser wurde an den oberen Schneidezähnen und an der Nase der Maus befestigt. Durch diese Halterung konnte die Maus dann im Kopfhalter unter der Empfangsspule richtig positioniert und fixiert werden. Für die Ruhigstellung des Körpers wurde eine kleine, im Haus Abbott Park hergestellte, speziell für Mäuse geeignete Röhre verwendet. Das restliche Vorgehen entsprach Kapitel 2.1.3.

Bei der MRT-Untersuchung wurden drei Darstellungskontraste genutzt. Ergänzend zur Spin-Spin-Relaxationszeit (T2) und T2*-gewichteten MRT (siehe Kapitel 2.1.3; Tab. 6) wurde bei diesem Versuch die Spin-Gitter-Relaxationszeit (T1) verwendet. Die T1-gewichteten MRT-Parameter sind in Tab. 7 aufgelistet, es wurden hierfür die mehrfach Schnitt- und mehrfach Echosequenzen (MSME) genutzt. Die T1- und T2-gewichteten MRTs wurden nur transversal durchgeführt, wohingegen die T2*-gewichteten MRTs zusätzlich auch horizontal gemessen wurden. Die Messung des T2*-gewichteten MRTs in zwei Ebenen wurde gewählt aufgrund von Publikationen, da bei klinischen Studien häufig die horizontale Ebene verwendet wurde.

Parameter	T1
Repetitionszeit [ms]	500
Echozeit [ms]	11
Wiederholungen	6
Bandbreite [Hz]	2700
Messfeld (FOV) [mm ³]	25,6 x 25,6 x 0,64
Bildmatrix	256 x 256 x 16
Bildaufnahmezeit [min]	12:48
Schnittdicke [µm]	1000
Anzahl der Schnitte	8
Auflösung in der gleichen Ebene [µm ²]	100 x 100
	MSME

Tab. 7. Darstellung der MRT-Parameter für den T1-gewichteten Kontrast

2.2.2.2. Histologie

Nach dem finalen *in vivo* MRT, wurde den Mäusen eine Überdosis des Medetomidin- und Ketamingemisches verabreicht (siehe Kapitel 2.2.2.1). Ferner wurde eine Perfusionsfixierung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung und 10 % neutralgepuffertem Formalin mit

Hilfe einer Peristaltikpumpe vorgenommen. Die Gehirnextraktion erfolgte erst nach dem finalen *ex vivo* MRT. Anschließend wurde eine Postfixierung in Formalin über Nacht und eine anschließende Inkubation für mindestens zwei Tage in 30 % Sucrose durchgeführt. Um die Ergebnisse der T2*-gewichteten MRT-Untersuchung zu verifizieren wurden die Gehirne vor dem Schneiden in die beiden Hemisphären separiert. Beide Gehirnhemisphären wurden mittels eines Kryostats (Leica Microsystems; Deutschland) in acht Serien a 30 µm geschnitten. Dabei wurde die rechte Hemisphäre transversal, rostro-kaudal von ca. 2,1 mm vor bis 3,08 mm nach Bregma und die linke Hemisphäre horizontal, dorso-ventral von ca. 0 mm bis 5,2 mm nach Bregma geschnitten (Paxinos und Franklin, 2001).

Für den Nachweis von Mikroblutungen wurde eine Preußisch-Blau-Färbung sowohl an den transversalen als auch an den horizontalen Schnitten durchgeführt. Die Durchführung entspricht dem Vorgehen in Kapitel 2.1.4. Aufgrund der geringeren Schnittdicken reduzierte sich die Färbezeit auf zwanzig Minuten. Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mit einem Axioplan2-Mikroskop und Neurolucida-Software.

2.3. Ergänzende Untersuchung durch histologische Marker

Dieser Teil der Untersuchung diente der Überprüfung der Wirksamkeit der chronischen Aβ-Behandlung aus Kapitel 2.2.2.2 durch den histologischen Nachweis von amyloiden Plaques. Weiterhin sollte hier die Natur von abnormen hypointensen thalamischen MRT-Signalen, welche in Kapitel 2.2.2.1 aufgetreten sind, abgeklärt werden. Verwendet wurden transversale und zum Teil horizontale Gehirnschnitte aus Kapitel 2.2.2.2.

2.3.1. Amyloide Plaques

Die Färbung der amyloiden Plaques zum Nachweis der Wirksamkeit der Aβ-Behandlung erfolgte mit Hilfe zwei verschiedener Methoden: der Immunhistologie (6G1) und der amyloiden Färbung (Kongorot). Für beide Färbungen wurden transversale Schnitte verwendet.

2.3.1.1. 6G1-Antikörper

Die immunhistologische Färbung der Plaques beruht auf der Bindung des 6G1-Antikörpers sowohl an lösliches als auch an fibrilläres Aβ-Protein. Sie wurde mit einem automatischen Discovery-Färbesystem (Ventana; USA) durchgeführt. Nach dem Einlegen der aufgezogenen Schnitte in das Discovery-System erfolgte eine antikörperabhängige

Vorbehandlung, indem eine Demaskierung von Antigenen durch die Behandlung mit Cell-Conditionierer² bei 100 °C stattfand (Ventana; USA). Darauf folgend wurden die Schnitte mit dem 6G1-Antikörper (1:500; Maus; Abbott Biocenter; USA) für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine weitere Inkubation mittels des passenden biotinylierten, zweiten Antikörpers (1:500; Esel Anti-Maus; Jackson ImmunoResearch; USA) für 32 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Alle weiteren Schritte (Blocken, chromogene DAB-Reaktion) wurden automatisch durch das Discovery-System und durch den Einsatz des DAB MAP Kits (Ventana; USA) durchgeführt. Nach Beendigung des Nachweises wurden alle Schnitte sehr gut gespült, dehydriert und zum Schluss eingedeckt. Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mittels des MiraxScan-Systems (Kamera plus Software; beides: Carl Zeiss; Deutschland).

2.3.1.2. Kongorot-Färbung

Mit der histochemischen Kongorot-Färbung werden, im Gegensatz zur 6G1-Färbung, nur die amyloiden Plaques nachgewiesen. Dafür wurden ebenfalls aufgezogene Schnitte verwendet. Die Schnitte wurden für 40 Minuten in einer alkalischen Natriumchlorid-Lösung und in einer alkalischen Kongorot-Lösung (beides: Congo Red Kit; Sigma-Aldrich; Deutschland) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten die Dehydrierung und das Eindecken der Schnitte. Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mit einem Axioplan²-Mikroskop und Neurolucida-Software.

2.3.2. Nissl-Färbung

Generell dient die Nissl-Färbung als Übersichtsfärbemethode bei der das gesamte Zellmaterial dargestellt wird. Die auftretenden Anfärbungen beruhen auf Kernmembranen, Nukleolen sowie dem Vorhandensein von Nissl-Schollen (Stapel von rauem endoplasmatischem Reticulum) im Zytoplasma. Zur Färbung wurden sowohl transversale als auch horizontale Gehirnschnitte von neun transgenen Mäusen plus eine Wildtyp-Maus *mit* und von fünf Tieren *ohne* thalamisches Signal im MRT verwendet (Kapitel 2.2.2.1).

Für die Nissl-Färbung wurden aufgezogene Schnitte für drei Minuten in Kresylviolet-Lösung (Sigma-Aldrich; Deutschland) und für fünf Minuten in Natriumacetat-Puffer (Sigma-Aldrich; Deutschland) inkubiert. Den Inkubationen folgten die Dehydrierung und das Eindecken der Schnitte. Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mit einem Axioplan²-Mikroskop und Neurolucida-Software.

2.3.3. Kalziumnachweis

Obwohl die Von Kossa-Färbung als Kalziumnachweis eingesetzt wird, kann Kalzium hierbei nicht direkt, sondern nur in Verbindung mit Karbonaten oder Phosphaten nachgewiesen werden. Dabei wird das Kalzium in den Verbindungen gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert.

Verwendet wurden wiederum transversale und horizontale Gehirnschnitte von neun transgenen Mäusen plus eine Wildtyp-Maus *mit* und von fünf transgenen Tieren *ohne* thalamisches Signal im MRT (Kapitel 2.2.2.1). Die aufgezogenen Schnitte wurden für fünfzehn Minuten in 1 % Silbernitrat-Lösung (Sigma-Aldrich; Deutschland) inkubiert. Nach einem intensiven Spülen in destilliertem Wasser, erfolgte eine dreiminütige Inkubation in 1 % Pyrogallolsäure (Sigma-Aldrich; Deutschland), gefolgt von einer dreiminütigen Inkubation in 5 % Natriumthiosulfat-Lösung (Sigma-Aldrich; Deutschland). Die Gegenfärbung erfolgte durch Neutralrot (FD Neuro Technologies; USA) für fünf Minuten. Nach der Dehydrierung und dem Eindecken der Schnitte erfolgte die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung mit einem Axioplan2-Mikroskop und Neurolucida-Software.

2.4. **Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung**

Bei diesem Versuch sollte die Entstehung von spontanen und induzierten Mikroblutungen *in vivo* mittels MRT verfolgt werden.

2.4.1. Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden fünfzehn transgene Mäuse mit der London-Mutation von APP (APP/Lo; B6,FVB/N - Tg(APP/V717I)) und acht Wildtyp-Mäuse (Wt) verwendet (Moechars et al., 1999). Alle Tiere stammten vom Versuchstierzüchter Taconic Farms Inc. (USA). Bei Versuchsbeginn waren die Mäuse 13-15 Monate alt und das durchschnittliche Gewicht betrug 16-21 g. Die verwendeten Tiere waren beiderlei Geschlechts und wurden in Zweiergruppen gehalten. Die Ernährungs- und Haltungsbedingungen sowie die Versuchsgenehmigungen entsprechen denen in Kapitel 2.2.1. Die Anästhesie erfolgte bei allen Tomographien i.p. mit einer Mischung aus Medetomidin (1 mg/kg KG) und Ketamin (75 mg/kg KG).

Die Mäuse wurden randomisiert in drei Gruppen unterteilt. Die Behandlung der ersten und der zweiten Gruppe, Wildtyp bzw. transgene Tiere, erfolgte mittels des unspezifischen anti-A β Antikörpers 6G1 (Abbott Biocenter; USA). Die dritte Gruppe bekam phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) appliziert (Tab. 8). Die Behandlung wurde in den ersten vier Wochen dreimal pro Woche mit einer Dosis von 0,5 mg pro Applikation i.p. durchgeführt. Aufgrund einer hohen Mortalitätsrate wurde die Behandlung auf einmal pro Woche reduziert. Insgesamt erstreckte sich der Behandlungszeitraum über zwölf Wochen (Abb. 5).

	Behandlung	n
Gruppe 1 (Wt)	6G1-Antikörper	8
Gruppe 2 (APP/Lo)	6G1-Antikörper	8
Gruppe 3 (APP/Lo)	PBS	7

Tab. 8. Behandlung und Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen

2.4.2. Magnetresonanztomographie

Vor Beginn des Versuchs und jeweils nach zwei, vier, acht und zwölf Wochen Behandlung wurden Tomographien durchgeführt (Abb. 5). Die Parameter für die Tomographien entsprechen denen in Kapitel 2.2.2.1. Allerdings wurde nur ein transversales MRT durchgeführt. Nach dem Behandlungsende, wurden weitere MRTs nach vier bzw. sechs Monaten durchgeführt (Abb. 5). Damit sollte die Entstehung von altersabhängigen Mikroblutungen, unabhängig von einer Behandlung, überprüft werden. Indes hatte sich aufgrund altersbedingter spontaner Todesfälle die Anzahl der Tiere auf folgende Gruppengrößen vermindert: n=1 bei den Wildtyp-Mäusen, n=7 bei den 6G1 behandelten APP/Lo-Mäusen und n=5 bei den PBS behandelten APP/Lo-Mäusen. Zu dem Zeitpunkt der Tomographien waren die Mäuse 20-22 bzw. 22-24 Monate alt.

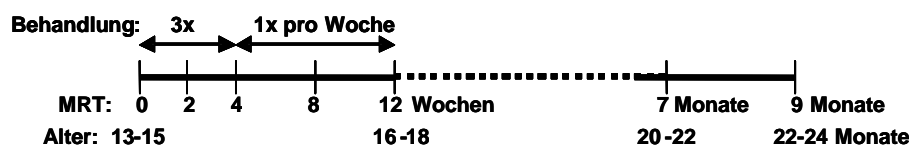


Abb. 5. Zeitpunkte an denen MRTs an den APP/Lo-Mäusen durchgeführt wurden

Das Schema zeigt die einzelnen Zeitpunkte für die Tomographien, die Behandlung und das entsprechende Alter.

2.4.3. Histologie

Eine histologische Aufarbeitung mit der Preußisch-Blau-Färbung erfolgte nur bei sechs Tieren. Die anderen Mäuse verstarben ohne die Möglichkeit einer histologischen Aufarbeitung.

Die Preußisch-Blau-Färbung wurde entsprechend Kapitel 2.2.2.2 durchgeführt.

2.5. **Nachweis von amyloiden Plaques mittels MRT**

Bei diesem Versuch wurde untersucht, ob amyloide Plaques mittels MRT *in vivo* dargestellt werden können und ob eine Beeinflussung dieser Plaques durch eine passive Immunisierung nachgewiesen werden kann.

Als Versuchstiere wurden transgene APP-Mäuse (Tg2576) plus Wildtypen verwendet. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwischen 14, 21 oder 25 Monate alt und das durchschnittliche Gewicht der Tiere betrug 20-25 g. Die Ernährungs- und Haltungsbedingungen sowie die Genehmigungen entsprechen denen in Kapitel 2.2.1. Alle Mäuse stammten vom Versuchstierzüchter Taconic Farms Inc. (USA). Die Anästhesie erfolgte bei allen Experimenten i.p. mit einer Mixtur aus Medetomidin (1 mg/kg KG) und Ketamin (75 mg/kg KG).

2.5.1. Nachweis von amyloiden Plaques ohne zusätzliche Markierung

Im ersten Versuch sollte überprüft werden, ob ein Plaquenachweis auch ohne zusätzliche Markierung der Plaques *in vivo* oder *ex vivo* mittels MRT möglich ist. Dafür wurden sechs männliche 21 Monate alte Tg2576-Mäuse verwendet. Der Ablauf und die Parameter für die Tomographien entsprechen denen in Kapitel 2.2.2.1, allerdings wurden nur die Darstellungskontraste Spin-Spin-Relaxationszeit (T2) und T2*-gewichtet verwendet. Da der Plaquenachweis durch eine Verringerung der Schnittdicke und eine optimierte Auflösung erzielt werden sollte, wurden die MRT-Parameter im T2*-gewichteten Kontrast modifiziert (Tab. 9). Die MRTs wurden transversal durchgeführt.

Parameter	T2*
Repetitionszeit [ms]	100
Echozeit [ms]	13
Wiederholungen	8
Messfeld (FOV) [mm ³]	25,6 x 25,6 x 6,4 bzw. 12,8
Bildmatrix	256 x 256 x 32 bzw. 64
Bildaufnahmezeit [min]	81 bzw. 150
Schnittdicke [µm]	150 bzw. 200
Anzahl der Schnitte	64 bzw. 30

Tab. 9. Darstellung der modifizierten MRT-Parameter für den T2*-gewichteten Kontrast

2.5.2. Nachweis von amyloiden Plaques mittels FSB-Markierung

2.5.2.1. *Histologische Überprüfung der FSB-Plauebindung*

Da die MRT-Darstellung von amyloiden Plaques ohne Markierung nicht erfolgreich war, sollte mittels FSB-Markierung [(E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)stryrylbenzen] amyloide Plaques *in vivo* dargestellt werden. Das von Abbott Biocenter (USA) synthetisierte FSB ist ein fluoreszierendes Derivat der amyloid-bindenden Farbstoffe Kongorot und Thioflavin T, wobei ein Fluormolekül integriert wurde. FSB besitzt damit nicht nur eine hohe Affinität für die β -Faltblattstruktur der Plaques, sondern auch ein geringes molekulares Gewicht. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften kann das FSB die Blut-Hirnschranke passieren und an die amyloiden Plaques binden (Higuchi et al., 2005; Sato et al., 2004). Damit werden amyloide Plaques für das MRT detektierbar.

Der erste Teil des Versuchs für den Einsatz von FSB war die Untersuchung der Wirksamkeit von FSB mit einer herkömmlichen histologischen Färbung. Dazu wurden sechs Transversalschnitte von 21 Monate alten Tg2576-Mäusen (aus Versuch 2.2.2.2) für 30 Minuten in 1 % FSB in 50 % Ethanol inkubiert. Nach einem anschließenden kurzen Eintauchen der Schnitte in gesättigtes Lithiumchlorid wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült, dehydriert und eingedeckt. Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mit einem Axioplan2-Mikroskop und Neurolucida-Software.

Das Ergebnis der FSB-Färbung wurde mit einer Kongorot-Plauefärbung verifiziert (Parameter siehe Kapitel 2.3.1.2).

2.5.2.2. *Bestimmung des Detektionslevels mittels MRT*

Der zweite Teil des Versuchs mit FSB war die Ermittlung der Detektion von FSB im MRT. Dazu wurde FSB in verschiedenen Konzentrationen (0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 mM) in destilliertem Wasser gelöst und in Glasflaschen (5 ml) im MRT gescannt.

Dazu wurde wiederum das 7.0 T Spektrometer von Bruker aus den vorherigen Versuchen eingesetzt. In Abweichung zu den vorherigen MRTs wurde hier allerdings ein anderer Spulentyp genutzt. In der verwendeten Spule für Radiofrequenz (RF; Bruker BioSpin; Deutschland) sind sowohl das Empfangs- als auch das Sendemodul integriert. Weiterhin ermöglicht dieser Spulentyp nicht nur die Detektion von Protonen (^1H) sondern auch von Fluormolekülen (^{19}F). Die 5 ml-Flaschen mit dem gelösten FSB wurden in einem speziellen Tierhalter von Bruker (Bruker BioSpin; Deutschland) unter einer RF-Spule (Abb. 6) befestigt und positioniert.



Abb. 6. Halterung mit RF-Spule von Bruker BioSpin
(Quelle: http://www.bruker-biospin.com/rf_coils.html)

Es wurde der T2-gewichtete Kontrast sowohl für die Darstellung von Protonen als auch von Fluormolekülen verwendet. Die MRT-Parameter für den T2-gewichteten Kontrast zur Protonendarstellung entsprechen denen in Kapitel 2.1.3. Die MRT-Parameter zur Detektion von Fluormolekülen sind in Tab. 10 aufgelistet. Alle Aufnahmen erfolgten transversal.

Parameter	^{19}F
Repetitionszeit [ms]	2000
Echozeit [ms]	5,5
Wiederholungen	225
Bandbreite [Hz]	50000
Messfeld (FOV) [mm ³]	25,6 x 25,6 x 12,8
Bildmatrix	256 x 256 x 64
Bildaufnahmezeit [min]	90
Schnittdicke [µm]	400
Anzahl der Schnitte	8
Auflösung in der gleichen Ebene [µm ²]	100 x 100
RARE-Faktor	32

Tab. 10. Darstellung der MRT-Parameter für den ^{19}F -gewichteten Kontrast

2.5.2.3. Ex vivo Plaquetfärbung mittels FSB-Markierung

Im dritten Versuchsteil wurde ein *ex vivo* Nachweis mit FSB-Markierung durchgeführt. Hierfür wurden zwei Tiere perfusionsfixiert: eine Tg2576-Maus und eine Wildtyp-Maus als Negativkontrolle. Beide Tiere waren 14 Monate alt. Nach der Perfusionsfixierung mit PBS und 10 % neutralgepuffertem Formalin wurden die Gehirne über Nacht in Formalin post-

fixiert. Anschließend erfolgte für insgesamt sieben Tage eine Inkubation in 2 % FSB in PBS mit 10 % DMSO. Tomographien wurden nach einem, drei, fünf und sieben Tagen Inkubation in FSB durchgeführt. Die Parameter für die Tomographien entsprechen denen in Kapitel 2.5.2.2. Für das MRT wurden die Gehirne jeweils in 1 % Agarose eingebettet und in einer Glasflasche im Tierhalter positioniert. Anschließend wurde die Agarose wieder entfernt und die Gehirne weiter in FSB inkubiert.

Nach siebentägiger Inkubation in FSB wurden die Gehirne in 30 % Sucrose eingelegt und anschließend mittels Kryostat in acht Serien transversal geschnitten. Die Schnittdicke betrug 30 μm . Eine Serie wurde unmittelbar nach dem Schneiden aufgezogen, getrocknet, dehydriert und eingedeckt. Später wurde eine weitere Serie für die Kongorot-Färbung verwendet (Parameter siehe Kapitel 2.3.1.2). Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mit einem Axioplan2-Mikroskop und Neurolucida-Software.

2.5.2.4. *In vivo* Plaquetfärbung mittels FSB-Markierung

Der letzte Teil der Untersuchung zum Plaquenachweis mittels MRT war die *in vivo* Markierung mit FSB. Dafür wurden zwei 25 Monate alte Tg2576-Mäuse verwendet. Die *in vivo* Markierung erfolgte durch eine fünfstündige i.v. Infusion von 500 μl 2 % FSB in PBS mit 10 % DMSO. An die Infusion schloss sich eine zweistündige Wartephase an, wodurch der Transport durch die Blut-Hirn-Schranke und die Bindung von FSB an die fibrillären A β -Strukturen der Plaques gewährleistet werden sollte. Anschließend wurde ein MRT durchgeführt, womit die Bindung von FSB an Plaque *in vivo* überprüft werden sollte. Die MRT-Parameter hierfür entsprachen denen in Kapitel 2.5.2.2. Da ein Tier während der Infusion verstarb, stand nur ein Tier für das nachfolgende MRT zur Verfügung.

Für den histologischen Vergleich wurden die Gehirne wie in Kapitel 2.5.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Eine Serie wurde unmittelbar nach dem Schneiden aufgezogen, getrocknet, dehydriert und eingedeckt. Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mit einem Axioplan2-Mikroskop und Neurolucida-Software.

2.6. Einfluss einer chronischen A β -Antikörperbehandlung auf den Metabolismus

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist neben dem MRT ein weiteres bildgebendes Verfahren welches zur Untersuchung von Morbus Alzheimer-Parametern eingesetzt werden kann. Einer dieser Parameter ist ein veränderter zerebraler Glukose-

metabolismus. Deshalb wurde bei diesem Experiment die Metabolismusrate von ^{18}F FDG (2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose), vor und nach einer A β -Antikörperbehandlung, bei transgenen Tieren gemessen. Ferner erfolgte eine histologische Aufarbeitung, wobei die Aufnahme von ^{14}C -2-Deoxy-D-Glukose (^{14}C -2-DG) und die Cytochrom-Oxidase C-Aktivität (COX) bestimmt wurden.

2.6.1. Versuchstiere

Für diesen Versuch wurden 22 weibliche transgene Mäuse mit einer Überexpression von humanen APP (Tg2576) und 22 weibliche Wildtyp-Mäuse verwendet. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere siebzehn Monate alt und wogen zwischen 19-45 g. Die Haltungsbedingungen und Genehmigungen entsprechen denen in Kapitel 2.2.1. Alle Mäuse stammten vom Versuchstierzüchter Taconic Farms Inc. (USA). Die Anästhesie für die PET-Untersuchungen erfolgte i.p. mit einer Mixtur aus Medetomidin (1 mg/kg KG) und Ketamin (75 mg/kg KG).

2.6.2. PET-Untersuchung mit ^{18}F FDG

Für den Versuch wurden vor und nach der Behandlung mit dem monoklonalen anti-A β Oligomer Antikörper A-887755 von Abbott Biocenter (USA; Ebert et al., 2008) zwei PET-Untersuchungen durchgeführt. Nach dem Basis-PET hatten die Mäuse eine Woche Rekonvaleszenzzeit, ehe mit der Behandlung begonnen wurde. Weil der Antikörper A-887755 ein Isotyp von Immunglobulin G 2a (IgG2a) war, wurde IgG2a als Kontrolle appliziert. Die Tiere wurden wie folgt in vier Gruppen unterteilt:

Wt: IgG2a	Tg2576: IgG2a	Wt: A-887755	Tg2576: A-887755
n=11	n=11	n=11	n=11

Tab. 11. Aufteilung der transgenen Mäuse (Tg2576) bzw. der Wildtyp-Mäuse (Wt)

Die Behandlung erfolgte aufgrund der Wirksamkeit des Antikörpers im Rhythmus von fünf Tagen und ging insgesamt über einen Zeitraum von 45 Tagen. Die Dosis betrug 0,5 mg pro Applikation.

Der verwendete Tomograph war ein multimodales Gerät aus mikroPET und Röntgencomputertomograph (CT) von Siemens Inveon (Siemens Medical Solutions; USA). Die PET-Aufnahmen wurden erzeugt mittels 64 Detektoren. Jeder dieser Detektoren besteht aus 20 x 20 Lutetium-Oxyorthosilikat-Kristallen, welche durch Lichtleiter mit einem positionssensitiven

Photomultiplier verbunden sind. Durch diese Kombination der Detektorkristalle besitzt das mikroPET eine sehr hohe Auflösungsrate und ist infolgedessen geeignet für den Einsatz bei kleinen Nagetieren.

Vor dem Start der Behandlung wurde eine Basis-Tomographie durchgeführt. Dazu wurde den nüchternen, anästhesierten Mäusen ca. 300 μCi ^{18}F FDG (IBA Molecular; USA) i.v. verabreicht. 43 Minuten nach der Applikation wurden die Tiere in das PET/CT-Gerät überführt. Zu Beginn wurde eine fünfminütige CT-Untersuchung durchgeführt. Nach weiteren zwei Minuten, 50 Minuten nach der ^{18}F FDG-Applikation, wurde eine zehn Minuten dauernde PET-Untersuchung gestartet. Nach der Tomographie wurde den Mäusen ein Antidot (Antisedan[®]) für das schnelle Erwachen aus der Narkose verabreicht.

Die Röntgencomputertomographie (X-Ray CT) wurde durchgeführt mit 500 Mikroampere, 80 Kilovolt und 220° in 174 Stufen bei kontinuierlicher Rotation. Die Bildaufnahmezeit betrug dabei fünf Minuten. Die Rekonstruktion der CT-Bilder wurde unter Anwendung des Sheep-Logan Algorithmus ohne „Down sampling“ mittels Cobra Software (Exxim Computing Corporation; USA) vorgenommen.

Die PET-Untersuchung wurde durchgeführt mit 511 Kilovolt, zehn Minuten Emission und statischer Datenaufnahme. Die Rekonstruktion der PET-Bilder erfolgte mittels 2D-OSEM Algorithmus (Ordered Subsets Expectation-Maximization).

Die Parameter für die finale PET-Untersuchung wurden leicht abgeändert. Im Gegensatz zur ersten Tomographie wurde den nüchternen, anästhesierten Mäusen eine Mischung aus ca. 250 μCi ^{18}F FDG und 14 μCi ^{14}C -2-DG (Perkin Elmer; USA) i.v. verabreicht. Die Parameter für die CT- und PET-Untersuchung wurden nicht verändert.

2.6.3. Histologie

Unmittelbar nach dem Abschluss der finalen PET-Untersuchung wurden die Tiere perfusionsfixiert (Parameter siehe Kapitel 2.1.4). Nach der Postfixierung in 10 % neutralgepufferten Formalin und in 30 % Sucrose wurden die Gehirne rostro-kaudal im Bereich von ca. 1,54 mm vor bis 2,92 mm nach Bregma (Paxinos und Franklin, 2001) in fünf Serien transversal geschnitten. Die Schnittdicke betrug 20 μm .

2.6.3.1. ¹⁴C-2-Deoxy-D-Glukose

Glukose ist ein Bestandteil des oxidativen Metabolismus von Zellen und trägt dadurch zur Energiegewinnung in Form von ATP bei. Dazu wird Glukose in die Zellen aufgenommen, wo sie durch die Glykolyse abgebaut wird. Im Fall von ¹⁴C-2-DG wird die Glykolyse bei ¹⁴C-2-Deoxy-Glukose-6-Phosphat aufgehalten. Die Ursache hierfür ist der Austausch einer Hydroxylgruppe gegen eine Hydrogengruppe (Sokoloff et al., 1977). Da ¹⁴C-2-Deoxy-Glukose-6-Phosphat nicht weiter abgebaut werden kann, verbleibt es in der Zelle. Deswegen kann ¹⁴C-2-DG als quantitative Methode zum Nachweis von Zellaktivität, z.B. von Neuronen, eingesetzt werden.

Eine Serie der geschnittenen Gehirne wurde für vier Wochen mit einem Kodak BioMax MR Film (Eastman Kodak Company; USA) bedeckt. Anschließend wurden die Kodak BioMax MR Filme mit dem automatischen Filmentwickler Hyperprocessor (Amersham Pharmacia Biotech; UK) entwickelt. Die Digitalisierung erfolgte mittels QICAM-Fast 1394-Kamera (QImaging; Kanada) und der Software Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics; USA).

Anschließend wurde an denselben Schnitten eine Nissl-Gegenfärbung durchgeführt (Parameter siehe Kapitel 2.3.2).

2.6.3.2. Cytochrom-Oxidase C

Cytochrom-Oxidase C (COX) ist ein integrales Transmembranprotein der inneren mitochondrialen Membran bei allen Eukaryoten (Wong-Riley, 1989). Das Enzym ist in den oxidativen Metabolismus von Neuronen involviert, indem es den Elektronenübergang von Cytochrom C auf molekularen Sauerstoff katalysiert. Neben der Entstehung von Wasser wird ATP als Nebenprodukt generiert. Dieses ATP kann aktiv Ionen zur Aufrechterhaltung bzw. zum Aufbau eines Membranpotentials durch die Membran transportieren. Dadurch wird wiederum der Transport anderer Moleküle gewährleistet, wie z.B. von Neurotransmittern. Aus diesem Grunde ist die COX-Aktivität, ebenso wie die 2-DG-Aufnahme, ein Index für metabolische bzw. neuronale Aktivität.

Für die Messung der COX-Aktivität wurden aufgezogenen Schnitte für 3 Stunden bei 37 °C in folgender Lösung inkubiert: 100 ml 1x PBS, 4 % Sucrose, 0,05 % DAB (Sigma-Aldrich; Deutschland), 0,03 % Cytochrom-Oxidase C (Fluka Analytical; Deutschland). Die auf dem Schnitt exprimierte COX produziert hierbei Elektronen, die auf das DAB übertragen werden und zu einer braunen Anfärbung führen. Danach wurden die Schnitte gespült, dehydriert

und eingedeckt. Die abschließende Digitalisierung der histologischen Färbung erfolgte mit einem Axioplan2-Mikroskop und Neurolucida-Software.

2.7. Auswertung und Statistik

Die statistische Analyse aller Versuchsergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software Inc.; USA). Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen.

2.7.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen mittels MRT

Die Bearbeitung und Visualisierung der T2*-gewichteten MRT-Bilder erfolgte mittels der Software Paravision (Bruker BioSpin; Deutschland). Mit dieser Software erfolgte auch die Flächenausmessung der hypointensen MRT-Signale im Kortex. Es wurden alle Schnitte eines Tieres verwendet, die ein hypointenses Signal aufwiesen. Danach wurde das Volumen ermittelt, indem alle gemessenen Flächen addiert und mit 0,4 mm (Schnittdicke) multipliziert wurden.

Die histologische Auswertung erfolgte durch die Vermessung der Hämosiderinablagerungen in allen entsprechenden Schnitten eines Tieres. Mittels der Software Image-Pro Plus 5.0 wurde die Fläche (Area of Interest) der Hämosiderinablagerungen bestimmt. Danach wurde das Volumen ermittelt, indem alle gemessenen Flächen addiert und mit 0,06 mm (Schnittdicke) multipliziert wurden.

Für die statistische Analyse wurden zum einen die MRT-Ergebnisse bzw. die histologischen Resultate mit den injizierten Volumina und zum anderen die MRT-Ergebnisse mit den histologischen Resultaten verglichen. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde aufgrund der geringen Gruppengröße ($n=5$) der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Anschließend wurden alle drei Vergleiche auf einen Zusammenhang mit einem zweiseitigen Korrelationstest (Pearson) überprüft. Dabei wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant und $p < 0,1$ als eine Tendenz angesehen. Ferner wurden die linearen Regressionsgeraden berechnet. Abschließend konnten Aussagen darüber getroffen werden, inwieweit die beiden Methoden, MRT und Histologie, miteinander vergleichbar sind und wie exakt die injizierten Mikroblutungen mittels MRT detektiert werden können.

2.7.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer A β -Antikörperbehandlung

Die Bearbeitung und Visualisierung in den T2*-gewichteten MRT-Bildern erfolgte mittels der Software Paravision. Dabei erfolgte die Auszählung der hypointensen Signale im Kortex und im Hippocampus rostro-kaudal im Bereich von 1,78 mm vor bis 3,08 mm nach Bregma (Paxinos und Franklin, 2001). Jedes hypointense Signal wurde als eine Mikroblutung gewertet. Hypointense Signale mit gleicher Lokalisation bei aufeinander folgenden Schnitten wurden als zwei Mikroblutungen gewertet. Die Zählung der hypointensen Signale wurde sowohl für das Basis- als auch das finale MRT durchgeführt. Für die Berechnung der neu entstandenen Mikroblutungen wurde die Differenz der Ergebnisse aus beiden Zählungen gebildet. Die Auszählung der Mikroblutungen erfolgte anhand der transversalen Aufnahmen.

Die histologische Auswertung erfolgte durch die Auszählung der Hämosiderinablagerungen mittels der Software Image-Pro Plus 5.0, ebenfalls rostro-kaudal im Bereich von ca. 1,78 mm vor bis ca. 3,08 mm nach Bregma (Paxinos und Franklin, 2001). Hämosiderinablagerungen, welche zusammenhängend auf einem Schnitt sichtbar waren, wurden als eine Mikroblutung gezählt. Bei gleicher Lokalisation bei aufeinander folgenden Schnitten wurden sie als zwei Mikroblutungen gewertet. Für die Auszählung der Mikroblutungen wurden sowohl die transversalen als auch die horizontalen Schnitte verwendet. Die unterschiedliche Größe der einzelnen Mikroblutungen wurde nicht berücksichtigt.

Für die statistische Überprüfung wurden sowohl die Ergebnisse vom MRT als auch die histologischen Daten auf ihre Normalverteilung hin untersucht. Aufgrund der geringen Tieranzahl in der 8F5-Gruppe wurde dazu der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Wegen der parametrischen Daten wurde eine One Way ANOVA (Analysis of Variance) durchgeführt. Falls diese einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) oder eine Tendenz ($p < 0,1$) ergab, wurde als post-hoc t-Test ein Bonferroni's Multiple Comparison t-Test für den Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen eingesetzt. Abschließend konnten Aussagen darüber getroffen werden, inwieweit die chronische Applikation von anti-A β Antikörpern die Ausbildung von Mikroblutungen beeinflusst und ob dies mit beiden Methoden gleichermaßen nachgewiesen werden kann.

Um die Aussagen zur Vergleichbarkeit zu stützen, wurden die Ergebnisse der MRT- und der histologischen Untersuchung mit einem zweiseitigen Korrelationstest (Pearson) überprüft. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ und als eine Tendenz $p < 0,1$ angesehen. Ferner wurde die lineare Regressionsgerade berechnet. Es wurden alle aufgetretenen Mikroblutungen der beiden Methoden miteinander verglichen, unabhängig von der vorherigen

Behandlung. Der Vergleich der beiden Methoden wurde zweimal durchgeführt, zum einen mit der Gesamtzahl der histologisch ermittelten Mikroblutungen und zum anderen mit der Anzahl der Mikroblutungen größer 60 µm.

2.7.3. Ergänzende Untersuchung von histologischen Markern

2.7.3.1. *Amyloide Plaques*

Die Auswertung der 6G1-Färbung erfolgte mittels der Software Image-Pro Plus 5.0. Dabei wurde das prozentuale Verhältnis der mit Plaques bedeckten Fläche zur Gesamtfläche des Hippocampus, des Neokortex und des Paläokortex ermittelt (= Plaquedichte). Pro Tier wurden jeweils drei Schnitte rostro-kaudal im rostralen (von 1,54 mm vor bis 0,14 mm nach Bregma), im medialen (von 1,22 mm bis 2,18 mm nach Bregma) und im kaudalen (von 2,30 mm bis 2,80 mm nach Bregma) Bereich ausgewertet (Paxinos und Franklin, 2001).

Statistisch überprüft wurden die gemittelten Messergebnisse für den Gesamtkortex, den Hippocampus und den Mittelwerten aus Gesamtkortex und Hippocampus. Des Weiteren wurden die gemittelten Messergebnisse aus dem rostralen, medialen und kaudalen Bereich, aufgeteilt nach Neo- und Paläokortex sowie Hippocampus, separat getestet. Für die Überprüfung der Ergebnisse auf ihre Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Der Grund hierfür ist die geringe Tieranzahl in der 8F5-Gruppe. Wegen der parametrischen Daten wurde eine One Way ANOVA durchgeführt. Falls diese einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) oder eine Tendenz ($p < 0,1$) ergab, wurde als post-hoc t-Test ein Bonferroni's Multiple Comparison t-Test für den Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen eingesetzt. Abschließend konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob die chronische Applikation von anti-A β Antikörpern die prozentuale Plaquedichte im Kortex bzw. Hippocampus beeinflusst und inwieweit eine unterschiedliche Plaqueverteilung in den einzelnen Bereichen vorliegt.

Bei der Kongorot-Färbung wurde eine qualitative Beurteilung vorgenommen. Eine Statistik wurde nicht durchgeführt.

2.7.3.2. *Nissl-Färbung*

Für die Auswertung wurde eine qualitative Beurteilung der Färbung vorgenommen. Eine Statistik wurde nicht durchgeführt.

2.7.3.3. Kalziumnachweis

Für die Auswertung der Kalziumfärbung wurde als Erstes eine qualitative Beurteilung der Ablagerungen im Thalamus mittels Software Image-Pro Plus 5.0 durchgeführt. Anschließend erfolgte eine tabellarische Gegenüberstellung der gesamten histologischen Resultate und der MRT-Ergebnisse.

Um einen Vergleich über die Größe der hypointensen thalamischen Signale in den MRT-Bildern und in den histologischen Schnitten treffen zu können, wurde bei beiden Methoden das Volumen berechnet. Anhand der T2*-gewichteten MRT-Bilder erfolgte mittels der Software Paravision die Flächenausmessung der hypointensen MRT-Signale im Thalamus. Es wurden alle Schnitte eines Tieres verwendet, die ein hypointenses Signal aufwiesen. Danach wurde das Volumen ermittelt, indem alle gemessenen Flächen addiert und mit 0,4 mm (Schnittdicke) multipliziert wurden. Die histologische Auswertung erfolgte durch die Ausmessung der Kalziumablagerungen in allen entsprechenden Schnitten eines Tieres. Mittels der Software Image-Pro Plus 5.0 wurde die Fläche der Kalziumablagerungen bestimmt. Anschließend wurde das Volumen ermittelt, indem alle gemessenen Flächen addiert und mit 0,03 mm (Schnittdicke) multipliziert wurden.

Um eine Aussage über die Vergleichbarkeit der Größe der Ablagerungen treffen zu können, wurden die Ergebnisse der MRT- und der histologischen Untersuchungen mit einem zweiseitigen Korrelationstest (Pearson) überprüft. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ und als eine Tendenz $p < 0,1$ angesehen. Ferner wurde die lineare Regressionsgerade berechnet.

2.7.4. Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung

Die Bearbeitung und Visualisierung der T2*-gewichteten MRT-Bilder erfolgte mittels Software Paravision. Dabei erfolgte die Auszählung der hypointensen Signale im Kortex und im Hippocampus rostro-kaudal im Bereich von 1,78 mm vor bis 3,08 mm nach Bregma (Paxinos und Franklin, 2001). Jedes hypointense Signal im Kortex oder Hippocampus wurde als eine Mikroblutung gewertet. Hypointense Signale mit gleicher Lokalisation bei aufeinander folgenden Schnitten wurden als zwei Mikroblutungen gewertet. Die Zählung der hypointensen Signale erfolgte bei allen durchgeführten Tomographien separat. Für die Berechnung der neu entstandenen Mikroblutungen wurden die Differenzen der Ergebnisse aus den Zählungen gebildet. Die Auszählung der Mikroblutungen erfolgte anhand der transversalen Aufnahmen. Aufgrund der geringen Anzahl der Mikroblutungen wurde keine

statistische Auswertung durchgeführt, sondern nur ein tabellarischer Vergleich. Abschließend konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob mittels MRT die Entwicklung von Mikroblutungen verfolgt werden kann.

Als Nebeneffekt dieser MRT-Untersuchungen traten wiederum Kalzifizierungen im thalamischen Bereich auf. Hierfür wurde jedes hypointense Signal im Thalamus als Kalzifizierung gewertet. Es wurde keine statistische Auswertung sondern ein tabellarischer Vergleich durchgeführt.

Für die histologische Auswertung wurde eine qualitative Beurteilung der Färbung vorgenommen. Eine statistische Korrelation mit den MRT-Ergebnissen erfolgte aufgrund der geringen Anzahl von Tieren nicht.

2.7.5. Nachweis von amyloiden Plaques mittels MRT

Für alle Versuche wurde die Auswertung in Form einer qualitativen Beurteilung der MRT-Bilder mittels der Software Paravision und der histologischen Bilder mittels der Software Image-Pro Plus 5.0 durchgeführt. Eine Statistik wurde nicht erstellt.

2.7.6. Einfluss einer chronischen A β -Antikörperbehandlung auf den Metabolismus

Die Datenanalyse der PET-Untersuchungen erfolgte durch die Bestimmung der quantitativen ^{18}F FDG-Aktivität im Gehirn mittels der Software Inveon Research Workplace (IRW). Nachdem die Bilder vom CT und vom PET mittels IRW übereinander gelegt wurden, konnte basierend auf den CT-Bildern eine Region des Interesses (ROIs) erstellt werden. Diese ROIs wurde mittels der Fläche von drei Schnittebenen (transversal, horizontal, sagittal) erzeugt und repräsentieren damit das gesamte Volumen innerhalb des Schädelknochens. Später wurde anhand der ROIs die ^{18}F FDG-Aktivität im Gehirn ermittelt [Bq/ml]. Diese gemessenen Werte, sowohl vom Basis-PET als auch vom finalen PET, wurden normalisiert (SUV = Standard Uptake Volume). Das SUV wurde wie folgt berechnet: *(gemessene Konzentration [Bq/ml] \div 37000) \div korrigierte ^{18}F FDG – Aktivität * Körpergewicht .*

Die Auswertung der ^{14}C -2-DG-Aufnahmen erfolgte mittels der Software Image-Pro Plus 5.0. Dabei wurde die optische Dichte der ^{14}C -Aktivität anhand einer Standardkurve ermittelt [kBq/g]. Es wurden digitalisierte Graustufenbilder verwendet. Ausgewertet wurden das Gesamtgehirn und separat der Gesamtkortex bzw. der Gesamthippocampus. Es wurden jeweils alle Schnitte pro Tier rostro-kaudal im Bereich von 1,78 mm vor bis 3,08 mm nach

Bregma gemessen (Paxinos und Franklin, 2001). Anschließend wurden alle Werte pro Tier und Areal gemittelt.

Die Auswertung der COX-Färbung erfolgte mittels der Software Image-Pro Plus 5.0. Dabei wurde die optische Dichte der COX-Aktivität ermittelt [%]. Verwendet wurden fünf Schnitte pro Tier rostro-kaudal im Bereich von 1,70 mm bis 2,18 mm nach Bregma (Paxinos und Franklin, 2001). Bei jedem Tier wurden vier Areale in beiden Hemisphären vermessen. Es wurden digitalisierte Graustufenbilder verwendet. Die betrachteten Areale waren die CA1-Region (Stratum radiatum, Stratum oriens, Stratum pyramidale), die CA3-Region (Stratum lucidum), der Gyrus dentatus (Stratum moleculare) und der Neokortex. Entsprechend der Ausdehnung wurden in jeder Schicht zweimal speziell kalibrierte Flächen (Area of Interest) vermessen: 1,875 μm^2 (Stratum pyramidale, Stratum oriens, Stratum lucidum); 10,000 μm^2 (Stratum radiatum) und 22,000 μm^2 (Neokortex, Corpus Callosum). Anschließend wurden alle Werte pro Tier und Schicht gemittelt. Weiterhin wurde die optische Dichte von eingedeckten Objektträgern (ohne Schnitt) bestimmt. Diese ermittelten Ergebnisse wurden als 100 %-Werte zusammen mit den Resultaten der Corpus Callosum-Messung für die Korrektur des Bildhintergrundes verwendet.

Die PET-Ergebnisse wurden für die statistische Überprüfung auf ihre Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov Test untersucht. Der Grund liegt hierfür in der geringen Tieranzahl in der nicht-transgenen Kontrollgruppe. Die Basiswerte wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Testes miteinander verglichen. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ und als eine Tendenz $p < 0,1$ angesehen. Bei den finalen PET-Ergebnissen wurde aufgrund der parametrischen Daten eine Two Way ANOVA durchgeführt. Falls diese einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) oder eine Tendenz ($p < 0,1$) ergab, wurde als post-hoc t-Test ein Bonferroni's Multiple Comparison t-Test für den Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen eingesetzt. Ferner wurde ein zweiseitiger, gepaarter t-Test zwischen den Basiswerten und den finalen Werten durchgeführt. Abschließend konnten Aussagen darüber getroffen werden, inwieweit die chronische Applikation eines anti-A β Oligomer Antikörpers die Stoffwechselaktivität im Gehirn beeinflusst.

Die histologischen Ergebnisse (2-DG-Aufnahme und COX-Aktivität) wurden für die statistische Überprüfung auf ihre Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov Test) hin untersucht. Aufgrund der parametrischen Daten wurde eine Two Way ANOVA durchgeführt. Falls diese einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) oder eine Tendenz ($p < 0,1$) ergab, wurde als post-hoc t-Test ein Bonferroni's Multiple Comparison t-Test für den Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen eingesetzt. Abschließend konnten Aussagen darüber getroffen werden,

inwieweit die chronische Applikation eines anti-A β Oligomer Antikörpers die Stoffwechselaktivität im Gehirn beeinflusst und ob dies mit den drei Methoden gleichermaßen nachgewiesen werden kann.

Um die Aussage der Vergleichbarkeit zu stützen, wurden die Ergebnisse der PET- und der 2-DG-Untersuchungen mit einem zweiseitigen Korrelationstest (Pearson) überprüft. Vom 2-DG-Nachweis wurden die Werte des Gesamtgehirns verwendet. Aufgrund der Tatsache das die COX-Aktivität anhand einzelner Schichten und nicht im Gesamtgehirn ermittelt worden ist, wurde kein Vergleich der Ergebnisse der PET- und der COX-Untersuchungen durchgeführt. Hingegen wurde ein regionaler Vergleich der Ergebnisse der COX- und der 2-DG-Untersuchungen, Neokortex gegenüber Kortex bzw. Gyrus Dentatus gegenüber Hippocampus, mit einem zweiseitigen Korrelationstest (Pearson) überprüft. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ und als eine Tendenz $p < 0,1$ angesehen. Ferner wurde die lineare Regressionsgerade berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen mittels MRT

Der Versuch, wie genau der Nachweis von Blutungen im Kortex mittels MRT ist, erfolgte durch einen Vergleich von in Rattenhirn injizierten Blutvolumina mit den beiden Nachweismethoden Magnetresonanztomographie (MRT) und Anfärbung in histologischen Schnitten. Abschließend erfolgte eine Korrelation der Ergebnisse von MRT und Histologie.

3.1.1. Korrelation der Daten vom MRT und des injizierten Blutvolumens

Für einen Vergleich zwischen injizierten Blutvolumina und deren Abbildung im MRT, wurde arterielles Blut in den Kortex von Ratten (n=11) appliziert. Die Injektion von vier verschiedenen Volumina (0,05 µl; 0,1 µl; 0,3 µl; 0,5 µl) erfolgte in beide Hemisphären. Da die Darstellung der hypointensen Signale im T2*-gewichteten MRT auf dem eisenhaltigen Hämoglobin des injizierten Blutes beruht, konnte unmittelbar nach der Injektion ein T2- und ein T2*-gewichtetes *in vivo* MRT durchgeführt werden. Indes wird für den histologischen Nachweis das Abbauprodukt Hämosiderin benötigt. Da der Abbau des Hämoglobins zu Hämosiderin ca. ein bis zwei Wochen benötigt, wurde ein weiteres T2- und T2*-gewichtetes *in vivo* MRT zwei Wochen nach der Blutinjektion durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse der MRT-Messung zwei Wochen nach der Injektion verwendet (Abb. 7).

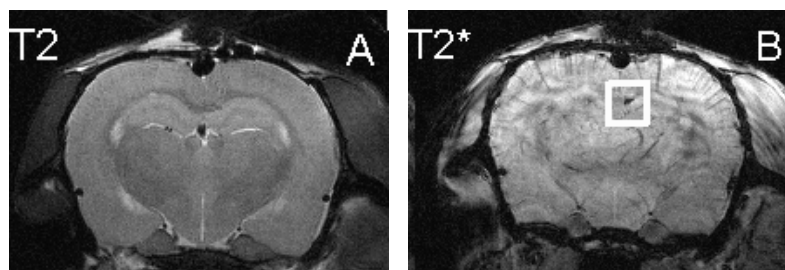


Abb. 7. Darstellung einer Injektion von arteriellem Blut in den Kortex einer Ratte mittels T2*-gewichteten MRT

Die transversalen Abbildungen zeigen die Blutablagerung zwei Wochen nach der Injektion. Dabei zeigt **A** den T2-gewichteten MRT-Kontrast, bei dem keinerlei hypointenses Signal im Kortex zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu ist bei dem T2*-gewichteten MRT-Kontrast in **B** ein starkes hypointenses (= dunkles) Signal zu erkennen (im Kästchen).

An den Injektionsstellen konnten starke Signalverluste im Gradientenecho des T2*-gewichteten MRTs festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnten beim T2-gewichteten MRT-Kontrast keine hypointensen Signale festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde für die weitere Analyse der T2*-gewichtete MRT-Kontrast verwendet. Das Ausmaß der

detektierten Signalverluste, Fläche und Anzahl der Schnitte mit einem hypointensen Signal, entsprachen den injizierten Volumina. Zur Auswertung wurden die Flächen dieser hypointensen Signale gemessen (Abb. 7 B). Für die Volumenberechnung wurden die einzelnen Flächen addiert und mit 0,4 mm (Schnittdicke) multipliziert. Die Überprüfung ergab in allen vier Gruppen eine gute Korrelation der mittels MRT berechneten Volumina gegenüber den injizierten Volumina (Abb. 8). Ein statistischer Vergleich ergab einen hoch signifikanten linearen Zusammenhang zwischen injiziertem und MRT-Blutvolumen (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r=0,8852$; $p<0,0001$; Abb. 8).

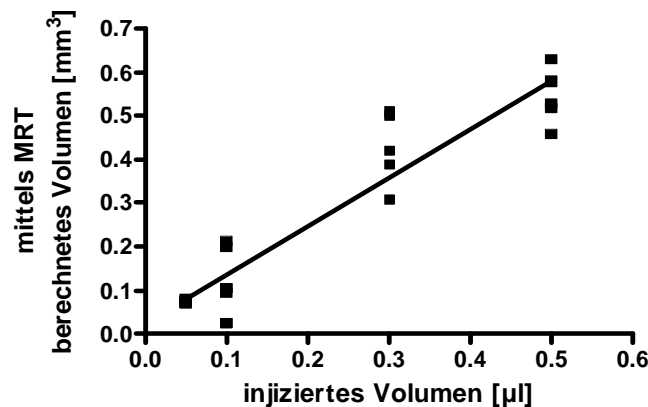


Abb. 8. Vergleich des kortikal injizierten Blutes und des durch MRT ermittelten Volumens

Jeweils 5 Tiere mit demselben Injektionsvolumen wurden ausgewertet (Ausnahme: die 0,1 µl-Gruppe - hier war $n=7$). Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit des durch MRT berechneten vom injizierten Blutvolumen und die lineare Regression zwischen beiden Volumina. Beide Parameter waren hoch signifikant linear korreliert (Korrelationskoeffizient $r=0,8852$; $p<0,0001$).

3.1.2. Korrelation der histologischen Daten und des injizierten Blutvolumens

Weiterhin erfolgte der Vergleich der injizierten Blutvolumina mit den histologisch nachweisbaren Hämosiderinablagerungen. Hierfür wurden die Gehirne nach dem finalen MRT histologisch aufgearbeitet. Anschließend wurde die Fläche der Hämosiderinablagerungen anhand einer Preußisch-Blau-Färbung vermessen (Abb. 9). Zur Volumenberechnung wurden die einzelnen Flächen addiert und mit 0,06 mm (Schnittdicke) multipliziert.

Die Auswertung ergab in allen vier Gruppen eine gute Übereinstimmung der mittels Hämosiderinablagerungen berechneten Volumina mit den injizierten Volumina (Abb. 10). Ein statistischer Vergleich mittels linearer Regression ergab einen hoch signifikanten linearen Zusammenhang (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r=0,9211$; $p<0,0001$).

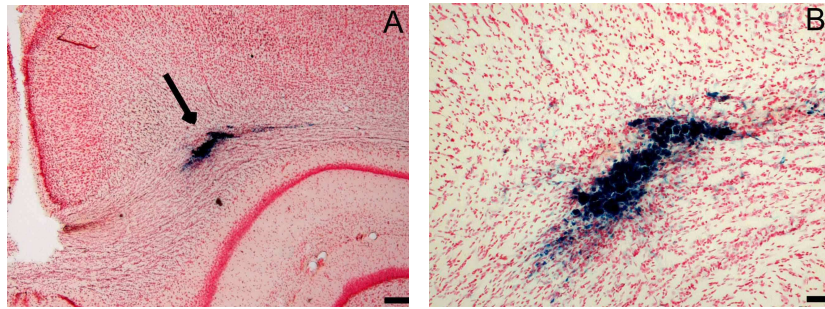


Abb. 9. Darstellung einer Injektion von arteriellem Blut in den Kortex einer Ratte mittels Preußisch-Blau-Färbung

Die transversalen Schnitte zeigen Hämosiderinablagerungen an der Injektionsstelle (Pfeil in **A**), welche durch den Abbau des arteriellen Blutes innerhalb von zwei Wochen gebildet wurden. **B** ist eine ca. 4-fache Vergrößerung von **A**. Maßstab: A=200 μm , B=50 μm .

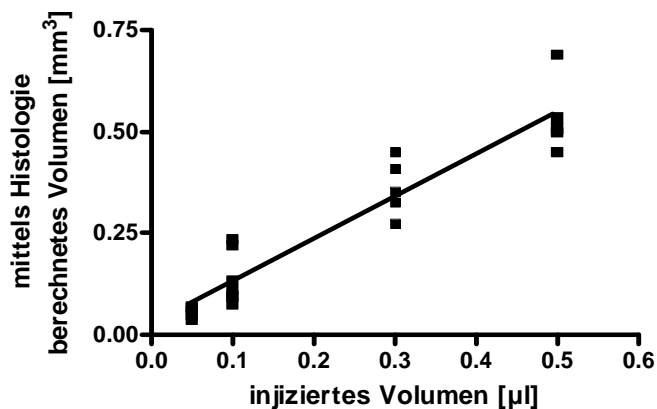


Abb. 10. Vergleich des kortikal injizierten Blutes und des histologisch ermitteltem Volumens

Jeweils 5 Tiere mit demselben Injektionsvolumen wurden ausgewertet (Ausnahme: die 0,1 μl -Gruppe - hier war $n=7$). Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit des histologisch berechneten vom injizierten Blutvolumen und die lineare Regression zwischen beiden Volumina. Beide Parameter waren hoch signifikant linear korreliert (Korrelationskoeffizient $r=0,9211$; $p<0,0001$).

3.1.3. Korrelation der berechneten Volumina von MRT und Histologie

Um beurteilen zu können, ob eine MRT-Untersuchung Blutablagerungen in vergleichbarer Weise wie eine histologische Analyse detektieren kann, wurde ein Vergleich der Ergebnisse von MRT und Histologie durchgeführt. Dazu wurden die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient (nach Pearson) der Ergebnisse aus beiden Methoden berechnet. Die statistische Auswertung ergab einen hoch signifikanten linearen Zusammenhang zwischen den Daten beider Methoden ($p<0,0001$; $r=0,8871$; Abb. 11).

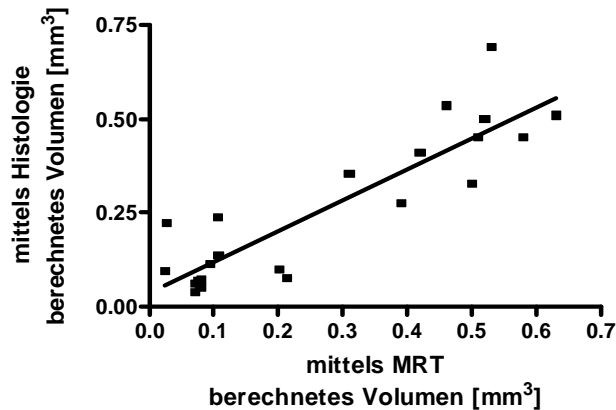


Abb. 11. Vergleich der mittels MRT ermittelten Volumina mit den histologischen Ergebnissen

Jeweils 5 Tiere mit demselben Injektionsvolumen wurden ausgewertet (Ausnahme: die 0,1 μl -Gruppe - hier war $n=7$). Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit des histologisch ermittelten vom durch MRT errechneten Blutvolumen und die lineare Regression zwischen beiden Volumina. Beide Parameter waren hoch signifikant linear korreliert (Korrelationskoeffizient $r=0,8871$; $p<0,0001$).

Obwohl die beiden Methoden leicht unterschiedliche Volumina ergaben, zeigen die Ergebnisse dieses Versuchs eine sehr gute Übereinstimmung beider Verfahren bei der Detektion von experimentell definierten Blutvolumina. Da selbst kleine Volumina in guter Übereinstimmung dargestellt wurden, war es möglich das MRT *in vivo* auch zum Nachweis von Mikroblutungen in den folgenden präklinischen Studien einzusetzen.

3.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer A β -Antikörperbehandlung

Die chronische gegen Amyloid-beta-Peptid (A β) gerichtete Antikörperbehandlung ist eine Form der passiven Immunisierung, bei der Nebenwirkungen in Form von Mikroblutungen in alten transgenen Mäusen mit einer Überexpression von Amyloid-Precursor-Protein (APP) auftreten können.

3.2.1. Nachweis mittels MRT

Der MRT-Nachweis zur Detektion von Mikroblutungen wurde an Mäusen mit einer Mutation von humanen APP (Tg2576) durchgeführt. Die Mikroblutungen wurden im Rahmen einer passiven Immunisierung durch eine dreimonatige Applikation mit den gegen A β gerichteten monoklonalen Antikörpern 6G1 und 8F5 induziert. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS; Vehikel) wurde als Kontrolle verwendet. Vor Beginn und nach Abschluss der Behandlung erfolgte eine *in vivo* Tomographie mit jeweils drei verschiedenen Darstellungskontrasten. Um feststellen zu können, ob ein Unterschied zwischen *in vivo* (Abb. 12 B, D) bzw. *ex vivo* (Abb. 12 C, E) Tomographien hinsichtlich der Anzahl von Mikroblutungen

besteht und um Perfusionsartefakte auszuschließen, wurden nach Beendigung der Applikation zwei finale MRTs durchgeführt: vor und nach der Perfusionsfixierung. Die verschiedenen gewichteten MRT-Aufnahmen bestätigen das Ergebnis, dass die hypointensen Signale nur mittels des T2*-gewichteten, aber nicht im T1- oder T2-gewichteten MRT-Kontrast (Abb. 12 A) dargestellt werden konnten. Weiterhin trat kein Unterschied zwischen den *in vivo* (Abb. 12 B, D) und *ex vivo* (Abb. 12 C, E) MRT-Bildern auf, so dass die Auswertung der Mikroblutungen anhand der *in vivo* MRT-Aufnahmen erfolgte. Obwohl die Mikroblutungen sowohl in transversalen als auch in horizontalen Schnittaufnahmen zu erkennen waren, wurden aufgrund der einfacheren Identifizierung nur die Ergebnisse der transversalen Schnitte für die statistische Auswertung genutzt (Abb. 12 B). Bei einer zusätzlich mitgeführten Wildtyp-Maus konnten keine Mikroblutungen nach einer zwölfwöchigen Applikation des anti-A β Antikörpers 6G1 detektiert werden. Statistisch wurde dieses Tier nicht erfasst.

Zu Beginn des Behandlungszeitraumes betrug die Größe jeder Gruppe $n=10$. Während des Versuchs verstarben einige Tiere, wodurch sich folgende finale Gruppengrößen ergaben: $n=8$ in der Kontroll- und 6G1-Gruppe und $n=6$ in der 8F5-Gruppe. Zur Überwachung des Gesundheitszustandes der Mäuse erfolgte während der Behandlungszeit eine Kontrolle der Körpergewichte (Abb. 13). Obwohl die Mäuse der 6G1- und der 8F5-behandelten Gruppe große Unterschiede bei den Körpergewichten aufwiesen, blieben die Gewichte während der Behandlung stabil. Daher kann von einer guten Verträglichkeit der monoklonalen anti-A β Antikörper ausgegangen werden.

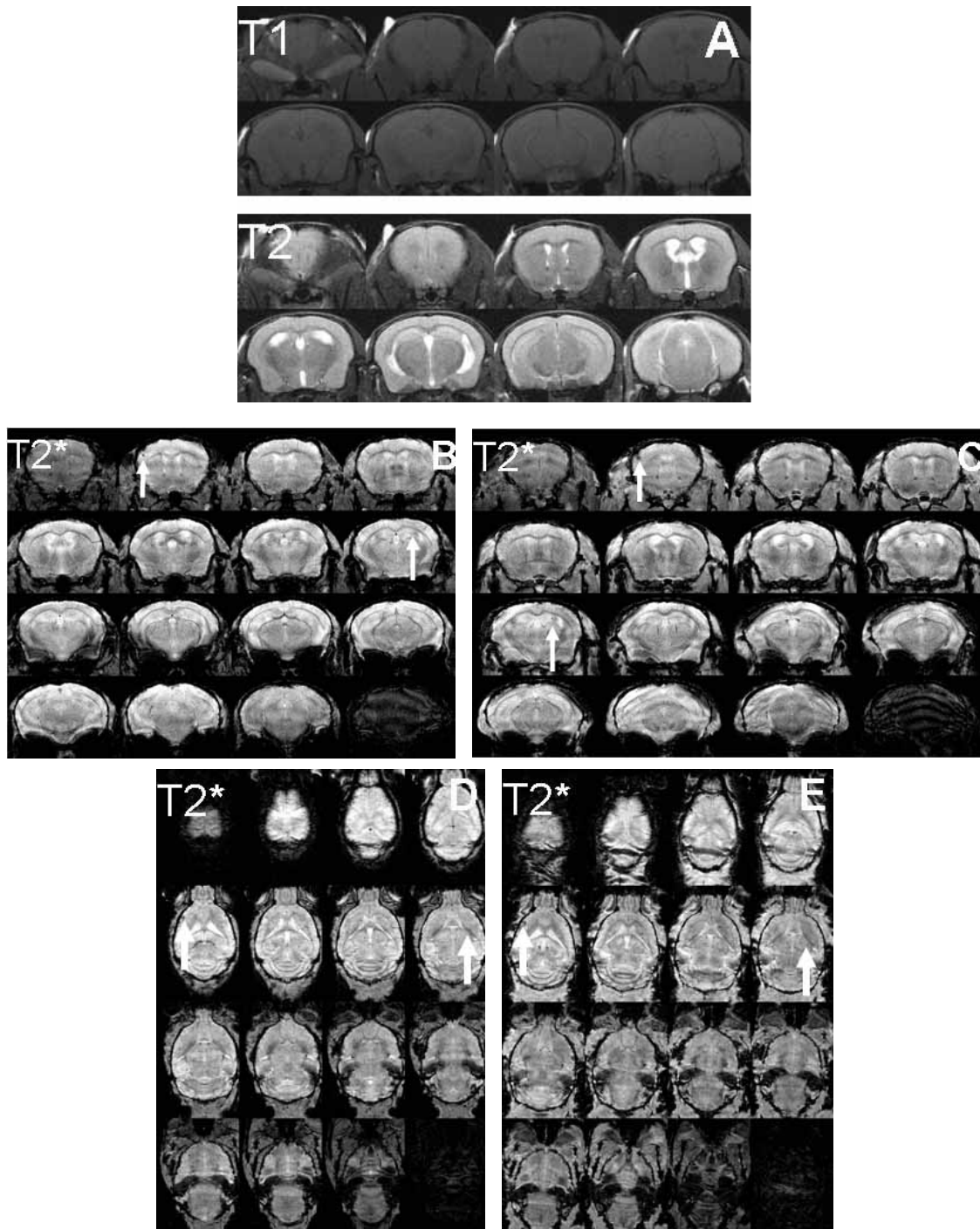


Abb. 12. Darstellung von Mikroblutungen im MRT bei einer anti-A β antikörperbehandelten Tg2576-Maus

A zeigt die T1- und T2-gewichteten Darstellungskontraste, mit denen keine Mikroblutungen darstellbar sind. Im Gegensatz dazu zeigen die T2*-gewichteten Abbildungen B - E Mikroblutungen im Kortex und im Hippocampus (Pfeile). A, B und C sind transversale Schnitte, D und E horizontale Schnitte. B und D sind *in vivo* Aufnahmen, während C und E *ex vivo* (nach Perfusion) aufgenommen wurden.

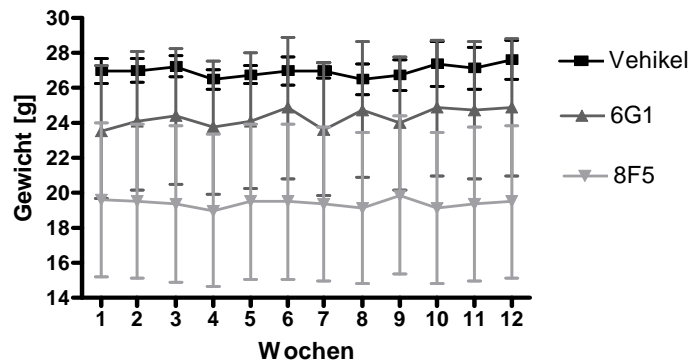


Abb. 13. Gewichtsentwicklung der Tg2576-Mäuse während einer passiven Immunisierung

Die mittleren Gewichte und Standardfehler von Tg2576-Mäusen, die entweder mit den anti-A β Antikörpern 6G1 und 8F5 oder dem Vehikel PBS behandelt wurden, sind dargestellt. Am ersten Applikationstag betrug die Gruppengröße in allen drei Gruppen n=10. Durch spontane Todesfälle reduzierten sich die Gruppen während des Behandlungszeitraums, so dass am Ende pro Gruppe je n=8 in PBS- und 6G1-Gruppe, sowie n=6 in 8F5-Gruppe vorhanden waren.

Unter Anwendung der Ausreißer-Regel (dreifache Standardabweichung vom Mittelwert) wurde ein Tier der Kontrollgruppe nicht zur statistischen Untersuchung der Mikroblutungen herangezogen, weil bei diesem Tier ungewöhnliche viele Mikroblutungen in nicht-kortikalen bzw. nicht-hippocampalen Regionen entstanden. Die quantitative Auswertung ergab, dass nach einer zwölfwöchigen Behandlung ein Anstieg der Mikroblutungen innerhalb der beiden Antikörpergruppen zu verzeichnen war (Abb. 14 A, B). Die Überprüfung dieser Werte mittels One Way ANOVA ($p=0,0015$) und einem anschließenden post-hoc t-Test ergab eine signifikante Erhöhung der Mikroblutungen nach einer chronischen 8F5-Behandlung ($p<0,05$). Bei der 6G1-Gruppe ergab sich nur eine Tendenz zum Anstieg der Mikroblutungen ($p<0,1$). In beiden antikörperbehandelten Gruppen war eine starke Variabilität zwischen den einzelnen Mäusen zu verzeichnen. Einige Tiere bildeten keine Mikroblutungen während der Behandlung, andere entwickelten dagegen sechs bis acht Mikroblutungen. Im Gegensatz zu den antikörperbehandelten Gruppen kam es bei der Kontrollgruppe zu keinem Anstieg der Mikroblutungen.

Anschließend wurde ein Vergleich der neu entstandenen Mikroblutungen zwischen den Behandlungsgruppen durchgeführt (Abb. 14 C, D). Die neu entstandenen Mikroblutungen errechnen sich aus den Differenzen zwischen basalen und finalen MRT. Wieder war ein Anstieg der Mikroblutungen bei der 6G1- und 8F5-Behandlung zu sehen. Die statistische Überprüfung der neuen Mikroblutungen der 6G1- und der 8F5-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe mittels One Way ANOVA ($p=0,0221$) und einem anschließenden post-hoc t-Test ergab eine signifikante Erhöhung der Mikroblutungen nach 8F5-Behandlung gegenüber

der Kontrollgruppe ($p < 0,05$), wohingegen die 6G1-Behandlung nur eine Tendenz für einen signifikanten Anstieg erkennen ließ ($p < 0,1$).

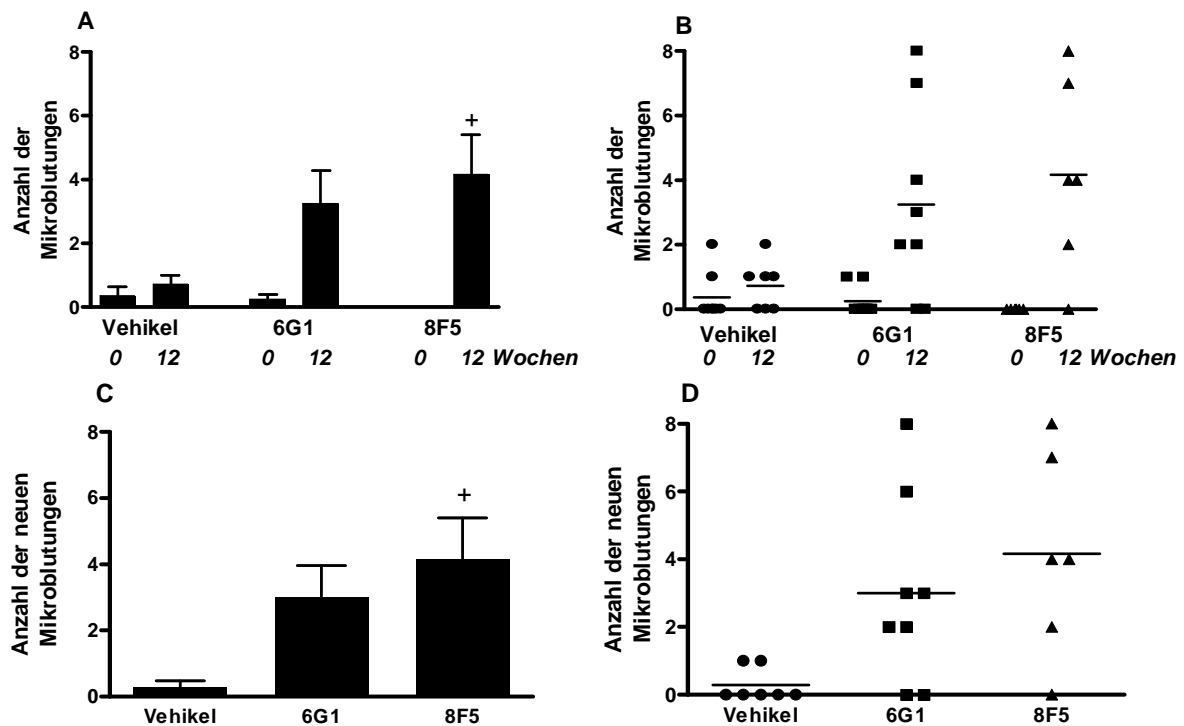


Abb. 14. Darstellung der Anzahl von Mikroblutungen im MRT nach einer passiven Immunisierung von Tg2576-Mäusen

A und C zeigen Mittelwerte und Standardfehler der detektierten gesamten und neu entstandenen Mikroblutungen nach Behandlung mit den Antikörpern 6G1 und 8F5 oder mit Vehikel (PBS; $n=8$ in 6G1-Gruppe; $n=7$ in Kontrollgruppe; $n=6$ in 8F5-Gruppe). B und D zeigen die Verteilung individueller Tiere und den Mittelwert. A und B stellen die Anzahl der gesamten detektierten Mikroblutungen im Basis- und im finalen MRT dar, während C und D die Anzahl der im Behandlungszeitraum neu entstandenen Mikroblutungen zeigen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels One Way ANOVA sowohl bei der Überprüfung der gesamten ($p=0,0015$) als auch der neu entstandenen ($p=0,0221$) Mikroblutungen ermittelt. Für beide Parameter ergab der post-hoc t-Test einen signifikanten Anstieg der Mikroblutungen nach 8F5-Behandlung ($p < 0,05$) und eine Tendenz für einen Anstieg nach 6G1-Behandlung ($p < 0,1$).

Abweichend von den erwarteten hypointensen Signalen (Mikroblutungen) im Kortex und Hippocampus, traten abnorm große hypointense Signale im Thalamus (neun Tiere; Abb. 15 A, B, C) und in anderen subkortikalen Regionen (zwei Tiere) auf (Abb. 15 D, E, F). Diese Signale wiesen eine differenzierte Morphologie und Intensität gegenüber den Mikroblutungen im Kortex auf. Indes unterschieden sich diese abnormen Signale selbst voneinander, und zwar durch die Darstellung mit dem T2-gewichteten Kontrast. Die thalamischen Signale waren, ebenso wie die Mikroblutungen, nur durch den T2*-gewichteten Kontrast nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten die abnormen Signale in den subkortikalen, nicht-thalamischen Arealen sowohl durch den T2- als auch im T2*-gewichteten Kontrast detektiert werden. Die Frage, ob diese Signale eine besondere Form

von Mikroblutungen sein könnten oder ob eine andere Ursache zu Grunde liegt, wurde in späteren histologischen Experimenten beantwortet (Kapitel 3.2.2 und 3.3.3).

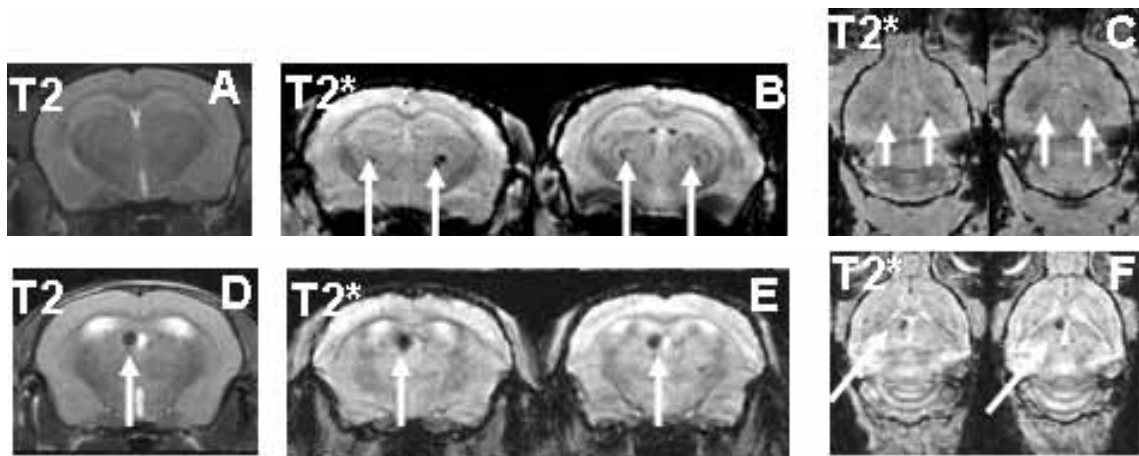


Abb. 15. Darstellung von abnorm großen hypointensen MRT-Signalen bei zwei anti-A β antikörper-behandelten Tg2576-Mäusen

Abnorm große Signale traten im Thalamus (A, B, C) und in anderen subkortikalen Regionen (D, E, F) auf (Pfeile). Der T2-gewichtete Kontrast zeigt nur das subkortikale nicht-thalamische (D), aber nicht das thalamische Signal (A). Dahingegen sind mit T2*-gewichteter Kontrast beide Signale erkennbar, sowohl in den transversalen (B, E) als auch in den horizontalen Schnittaufnahmen (C, F).

Die Auswertung der MRT-Bilder zeigt, dass eine Bestimmung der Mikroblutungen mittels MRT im Zuge einer Antikörperbehandlung möglich ist. Ferner kann mittels MRT ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die mit verschiedenen Antikörpern behandelt wurden, festgestellt werden. Allerdings konnte mittels MRT nicht die Ursache für die abnormen Signale im Thalamus und in anderen subkortikalen Regionen geklärt werden.

3.2.2. Nachweis mittels Histologie

Den Effekt der chronischen anti-A β Antikörperbehandlung auf die Entwicklung von Mikroblutungen bei transgenen Tg2576-Mäusen wurde auch auf die herkömmliche histologische Weise überprüft. Dazu wurden die Gehirne der Mäuse nach dem finalen MRT histologisch aufgearbeitet. Die Hirnhemisphären wurden nach der Perfusion geteilt. Da das MRT sowohl transversal als auch horizontal durchgeführt wurde, erfolgte das Schneiden der rechten Hemisphäre transversal und der linken Hemisphäre horizontal. Beide Hemisphären wurden für die histologische Auszählung verwendet. Die Anzahl der Tiere entspricht denen in Kapitel 3.2.1. Nach Anwendung der Ausreißer-Regel wurde ein Tier der Kontroll-Gruppe aus der statistischen Auswertung herausgenommen, da bei diesem Tier ungewöhnliche viele Mikroblutungen in nicht-kortikalen bzw. nicht-hippocampalen Regionen entstanden sind. Die Auswertung erfolgte im Bereich von 1,54 mm vor bis 2,92 mm nach Bregma (Paxinos und

Franklin, 2001). In der zusätzlich mitgeführten Wildtyp-Maus konnten keine Mikroblutungen nachgewiesen werden: sie wurde statistisch nicht erfasst.

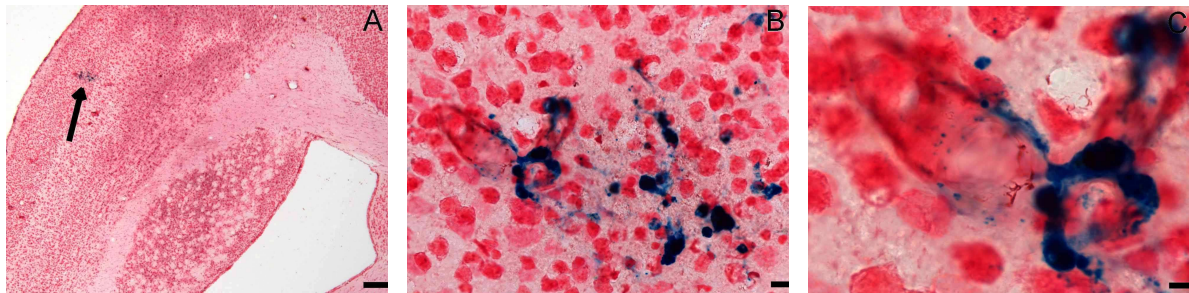


Abb. 16. Darstellung einer Mikroblutung mittels Preußisch-Blau-Färbung bei einer anti-A β antikörper-behandelten Tg2576-Maus

Die Horizontalschnitte zeigen eine Mikroblutung (Pfeil in **A**) im Kortex einer Tg2576-Maus, die zuvor für zwölf Wochen mit dem Antikörper 8F5 behandelt wurde. **B** und **C** sind Vergrößerungen von **A**. Die gezeigten Hämosiderinablagerungen liegen an oder um eine Gefäßwand. Maßstab: A=200 μ m, B=10 μ m, C=5 μ m.

Die Abbildungen 16 A - C verdeutlichen, dass eine im Kortex lokalisierte Mikroblutung kein zusammenhängender Komplex ist, sondern aus mehreren kleinen Ablagerungen von Hämosiderin besteht. Hämosiderinablagerungen können in einem lockeren Verbund im Gewebe oder in einer bzw. um eine Gefäßwand lokalisiert sein (Abb. 16 B, C). Aus der Anzahl der Hämosiderinablagerungen ergibt sich die Größe einer Mikroblutung. Allerdings wurde die Anzahl der Hämosiderinablagerungen pro Mikroblutung nicht separat analysiert. Die Auswertung der ausgezählten Mikroblutungen ergab, dass nach einer zwölfwöchigen Behandlung ein Anstieg der Mikroblutungen in den beiden antikörperbehandelten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen war (Abb. 17 A, B). Die Überprüfung der Werte mittels One Way ANOVA ($p=0,0282$) und einem anschließenden post-hoc t-Test ergab eine signifikante Erhöhung der Mikroblutungen nach 6G1-Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe ($p<0,05$), wohingegen nach 8F5-Behandlung nur eine Tendenz für einen signifikanten Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar war ($p<0,1$). Innerhalb der beiden mit Antikörper behandelten Gruppen traten starke Varianzen zwischen den einzelnen Tieren auf.

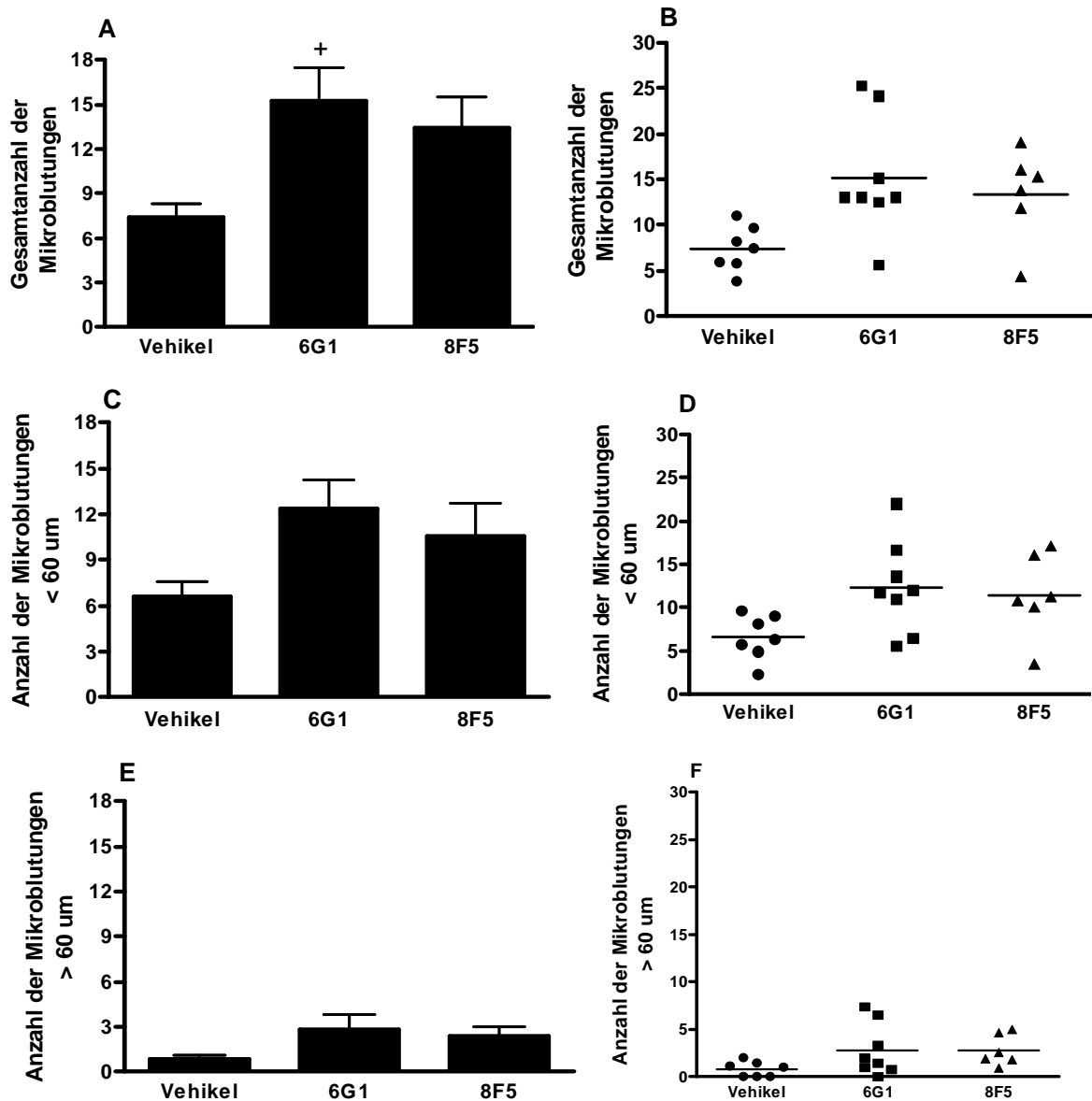


Abb. 17. Darstellung der Anzahl von Mikroblutungen mittels Preußisch-Blau-Färbung nach einer passiven Immunisierung bei Tg2576-Mäusen

A, C und E zeigen Mittelwerte und Standardfehler der mit Preußisch-Blau-Färbung dargestellten Mikroblutungen (n=8 in 6G1-Gruppe; n=7 in Kontrollgruppe; n=6 in 8F5-Gruppe). B, D und F zeigen die Verteilung individueller Tiere und den Mittelwert. A und B stellen die Gesamtanzahl der gezählten Mikroblutungen dar, während C und D die Anzahl der Mikroblutungen kleiner als 60 μm und E und F die Anzahl der Mikroblutungen größer als 60 μm zeigen. Die Überprüfung mittels One Way ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied der Gesamtanzahl der Mikroblutungen zwischen den Behandlungsgruppen ($p < 0,5$). Der post-hoc t-Test (Bonferroni) belegte einen signifikanten Unterschied zwischen Vehikel versus 6G1-Behandlung ($p < 0,05$).

Die Anzahl der histologisch ermittelten Mikroblutungen war deutlich höher als im MRT. Eine wahrscheinliche Ursache dafür ist das begrenzte Auflösungsvermögen vom MRT von einem Voxel (100 μm x 100 μm). Aufgrund dessen wurde die Größe der histologischen Mikroblutungen ermittelt, welche für das MRT detektierbar waren. Durch eine mikroskopische Größenbestimmung von histologischen Mikroblutungen wurde nachgewiesen, dass diese ab

einer Größe von 60 μm im MRT detektierbar waren. Daraufhin wurden die histologisch ermittelten Mikroblutungen in zwei Gruppen unterteilt: kleiner 60 μm (Abb. 17 C, D) oder größer 60 μm (Abb. 17 E, F). Anhand der Größenaufteilung konnte festgestellt werden, dass die Mehrheit der Mikroblutungen kleiner als 60 μm ist und somit nicht mittels MRT nachgewiesen werden kann. Die statistische Auswertung der beiden Gruppen ergab ein ähnliches Bild wie in der Gesamtgruppe. Es war ein Anstieg der Mikroblutungen in den beiden behandelten Gruppen zu verzeichnen, indessen aufgrund der hohen Varianz nicht statistisch signifikant (One Way ANOVA; $p > 0,05$).

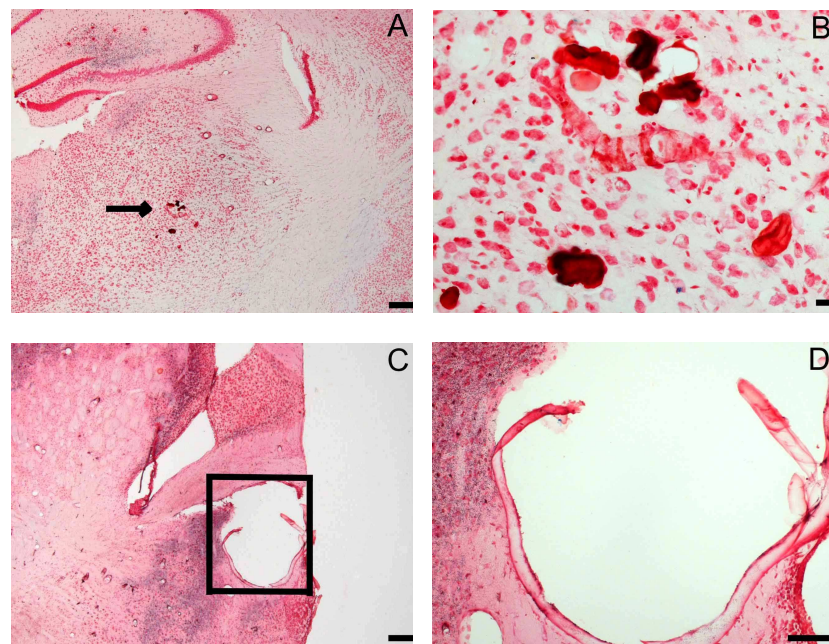


Abb. 18. Darstellung der Preußisch-Blau-Färbung hinsichtlich der abnormen MRT-Signale bei zwei anti- α antikörperbehandelten Tg2576-Mäusen

A und **B** zeigen Transversalschnitte der Regionen der thalamischen Signale (**A**: Pfeil), während **C** und **D** ein Aneurysma in Horizontalschnitten zeigen (**C**: Kasten). Die Preußisch-Blau-Färbung war in beiden Regionen mit abnorm großen hypointensen Signalen negativ. **B** und **D** sind Vergrößerungen von **A** und **C**. Maßstab: $A/C=200 \mu\text{m}$, $B=20 \mu\text{m}$, $D=100 \mu\text{m}$.

Die Natur der abnormen hypointensen MRT-Signale, welche im Thalamus (Abb. 18 A, B) und in anderen Regionen (Abb. 18 C, D) aufgetreten sind, konnten mittels Preußisch-Blau-Färbung nur teilweise aufgeklärt werden. Mikroblutungen konnten bei den thalamischen Signalen ausgeschlossen werden, weshalb weitere histologische Färbungen erfolgten (Kapitel 2.3 und 3.3). Hingegen konnte das abnorm große Signal in der subkortikalen, nicht-thalamischen Region als Aneurysma identifiziert werden. Der histologische Schnitt weist auf ein abnormal vergrößertes Gefäß (Aneurysma) hin. Aneurysmen haben die Tendenz nach dem Verschwinden des Blutdruckes zusammenzufallen und im histologischen Bild nur Überbleibsel von erweitertem Gewebe zu hinterlassen.

3.2.3. Vergleich von MRT und Histologie

In Kapitel 3.1 konnte belegt werden, dass die durch Histologie und MRT ermittelten Volumina von Mikroinjektionen miteinander korrelieren. Aber die Größe der Mikroblutungen (μm -Bereich) liegt weit unter der Größe der Mikroinjektionen (mm-Bereich). Aus diesem Grunde wurden die mit beiden Methoden ermittelten *in vivo* Mikroblutungen verglichen. Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens vom MRT (Voxelgröße) wurden zwei getrennte Auswertungen durchgeführt: MRT-Ergebnisse im Vergleich zur Gesamtzahl der histologischen Mikroblutungen (Abb. 19 A) und MRT-Ergebnisse im Vergleich zur Anzahl der histologischen Mikroblutungen größer 60 μm (Abb. 19 B).

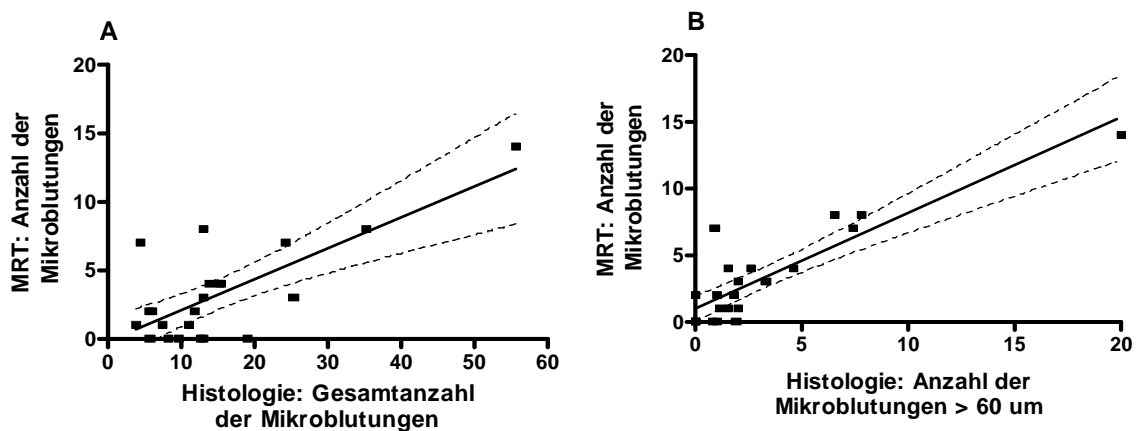


Abb. 19. Vergleich der mittels MRT und Histologie nachgewiesenen Mikroblutungen

Die Abbildungen zeigen die individuellen Werte und die linearen Regressionsgeraden der mittels MRT und Preußisch-Blau-Färbung ermittelten Mikroblutungen ($n=22$). Die Parameter waren jeweils signifikant korreliert (Korrelationskoeffizient $r=0,7404$; $p=0,026$ (A) und $r=0,8776$; $p<0,0001$ (B)).

Der Vergleich der Gesamtzahl der Mikroblutungen mit den mittels MRT ermittelten Mikroblutungen ergab einen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen den beiden Analysen ($p=0,026$; Korrelationskoeffizient nach Pearson: von $r=0,7404$; Abb. 19 A). Obwohl die Anzahl der Mikroblutungen in der Preußisch-Blau-Färbung deutlich höher liegt als im MRT, kann das Auftreten von Mikroblutungen mit beiden Methoden in vergleichbarer Weise ermittelt werden. Ebenfalls einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden Methoden ergab der Vergleich der histologischen Mikroblutungen größer 60 μm mit den mittels MRT ermittelten Mikroblutungen ($p<0,0001$; Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r=0,8776$; Abb. 19 B).

Die histologisch nachweisbaren Mikroblutungen verifizieren damit die im MRT ermittelten Signale korrekt als Mikroblutungen, obwohl die Anzahl der histologischen Mikroblutungen deutlich höher waren als die im MRT gezählten Mikroblutungen. Nach diesem Ergebnis ist

das MRT eine adäquate *in vivo* Methode und zeitsparender Ersatz der Preußisch-Blau-Färbung, um Mikroblutungen als Nebenwirkungen in präklinischen Immunisierungsstudien nachzuweisen.

3.3. Ergänzende Untersuchung von histologischen Markern

In diesem Kapitel werden weitere Aspekte einer chronischen gegen A β gerichteten Antikörperbehandlung untersucht. Das Material ist dasselbe wie bei den Untersuchungen zur Verstärkung der Mikroblutungen. Eine Fragestellung ist die Wirkung der Antikörperbehandlung auf fibrilläres bzw. nichtfibrilläres A β . Ein weiteres Ziel ist die Abklärung der Natur der hypointensen thalamischen MRT-Signale.

3.3.1. Auswirkungen der anti-A β Antikörperbehandlung auf amyloide Plaques

Ein Charakteristikum der Morbus Alzheimer-Erkrankung ist das Auftreten von löslichem A β und amyloiden Plaques, insbesondere im Kortex und im Hippocampus. Die Untersuchung, ob die Plaques durch eine chronische passive Immunisierung beeinflusst werden, erfolgte mittels eines immunhistochemischen Nachweises von Plaques durch Antikörper 6G1. Der Antikörper 6G1 bindet an N-terminale Sequenzen von A β in Plaques. Für die Auswertung wurde eine Bestimmung der prozentualen Plaquedichte in Bezug zur Gesamtfläche vom Neo- und Paläokortex bzw. Hippocampus durchgeführt. Die prozentuale Plaquedichte wurde in drei Bereichen (rostral, medial, kaudal) in jeweils drei Schnitten gemessen (Abb. 20). Eine zusätzliche histologische Kongorot-Färbung für amyloide Plaques bestätigte die 6G1-Färbung, wurde jedoch nicht quantitativ ausgewertet.

Die Auswertung der gemittelten, prozentualen Plaquedichte im Gesamtkortex, Hippocampus und den Mittelwerten aus Gesamtkortex und Hippocampus, ergab keine statistisch signifikante Veränderung durch die Antikörperbehandlung (One Way ANOVA; $p > 0,05$; Abb. 21). Allerdings ist ein Trend erkennbar, wonach die 6G1- und die 8F5-Behandlung eine leicht erhöhte Plaquedichte gegenüber der Kontrollgruppe verursachen. Dies ist sowohl im Kortex, im Hippocampus als auch in den Gesamtwerten von Kortex und Hippocampus erkennbar. Weiterhin ist festzustellen, dass die prozentuale Plaquedichte im Kortex höher als im Hippocampus ist. Die Mittelwerte der Plaquedichte liegen im Kortex zwischen 26-33,5 %, wohingegen sie im Hippocampus zwischen 19,2-24,2 % betragen.

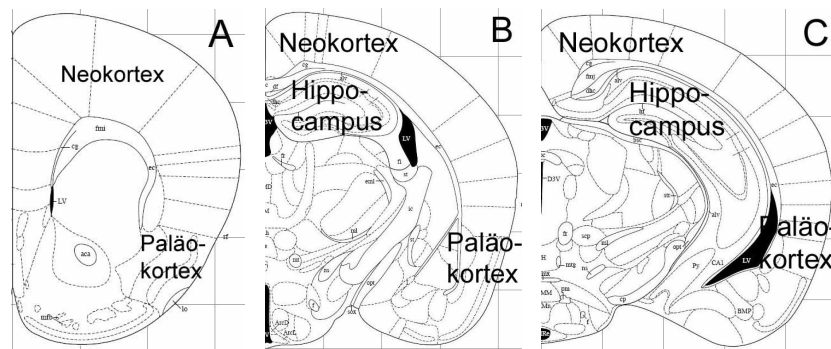


Abb. 20. Areale für die prozentuale Plaquelächen-Auswertung nach Anfärbung mit Antikörper 6G1

A, B und C zeigen die Areale, welche zur Auswertung verwendet wurden: A: rostral = 1,54 mm vor bis 0,14 mm nach Bregma, B: medial = 1,22 mm bis 2,18 mm nach Bregma, C: kaudal = 2,30 mm bis 2,80 mm nach Bregma (Paxinos und Franklin, 2001).

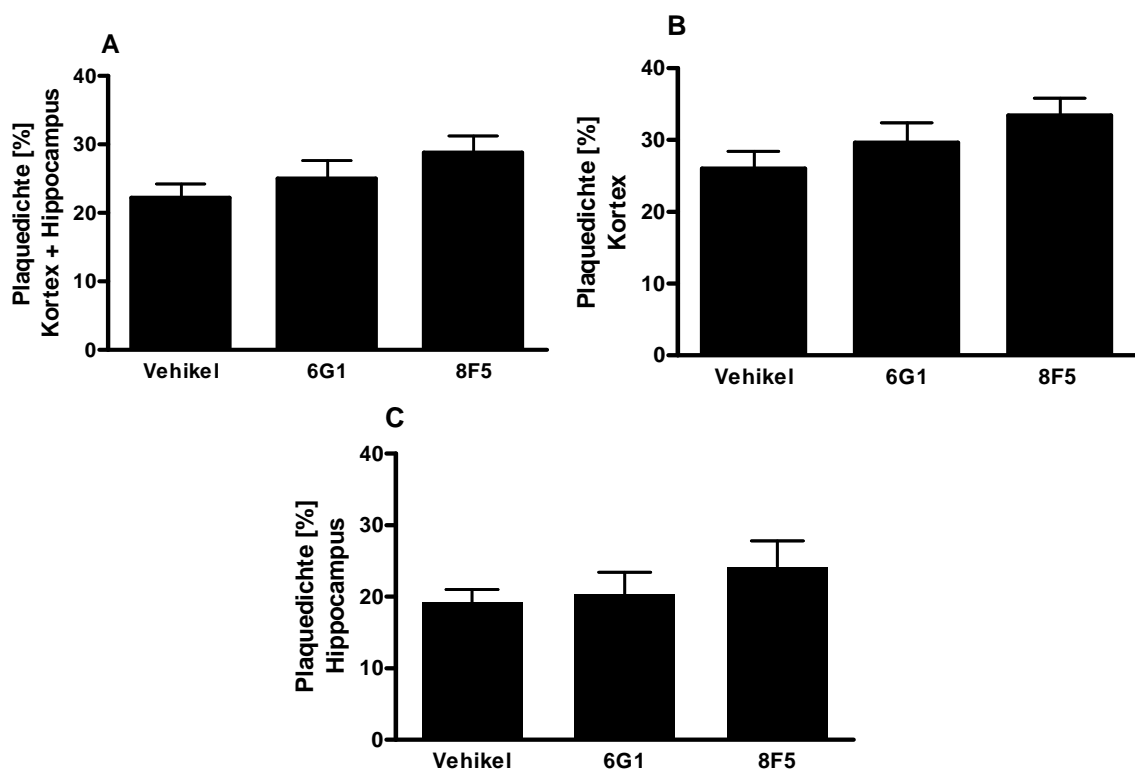


Abb. 21. Effekte der chronischen anti-A β Antikörperbehandlung auf die prozentuale Plaquedichte bei Tg2576-Mäusen

Die Daten sind mittlere Anteile der Gesamtfläche und Standardfehler, die von amyloiden Plaques bedeckt sind, nach Behandlung mit den anti-A β Antikörpern 6G1 (n=8) und 8F5 (n=6) oder dem Vehikel PBS (n=8). Die Graphen zeigen die gemittelte prozentuale Plaquedichte des Kortex und Hippocampus (A) bzw. aufgeteilt nach Kortex (B) und Hippocampus (C). Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (One Way ANOVA; $p > 0,05$).

Für die Untersuchung der Verteilung der gemittelten Plaquedichte pro Fläche im Gehirn wurden einzelne Areale separat untersucht (Abb. 22). Die weitere Aufteilung des Kortex in rostrale, mediale und kaudale Bereiche ergab für den Neokortex keine signifikanten Unterschiede der Plaquedichten zwischen den Gruppen (One Way ANOVA; $p > 0,05$). Im Gegensatz dazu war im Paläokortex ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu

verzeichnen (One Way ANOVA; $p=0,0389$). Indes zeigte der post-hoc t-Test keine signifikanten Ergebnisse beim Vergleich der einzelnen Gruppen. Die weitere Unterteilung des Hippocampus in mediale und kaudale Bereiche ergab ebenfalls keinerlei signifikanten Unterschiede (One Way ANOVA; $p>0,05$). Allerdings ist auch hier eine Tendenz zu einer erhöhten Plaquesammlung in den beiden Antikörpergruppen, insbesondere nach 8F5-Behandlung, zu erkennen.

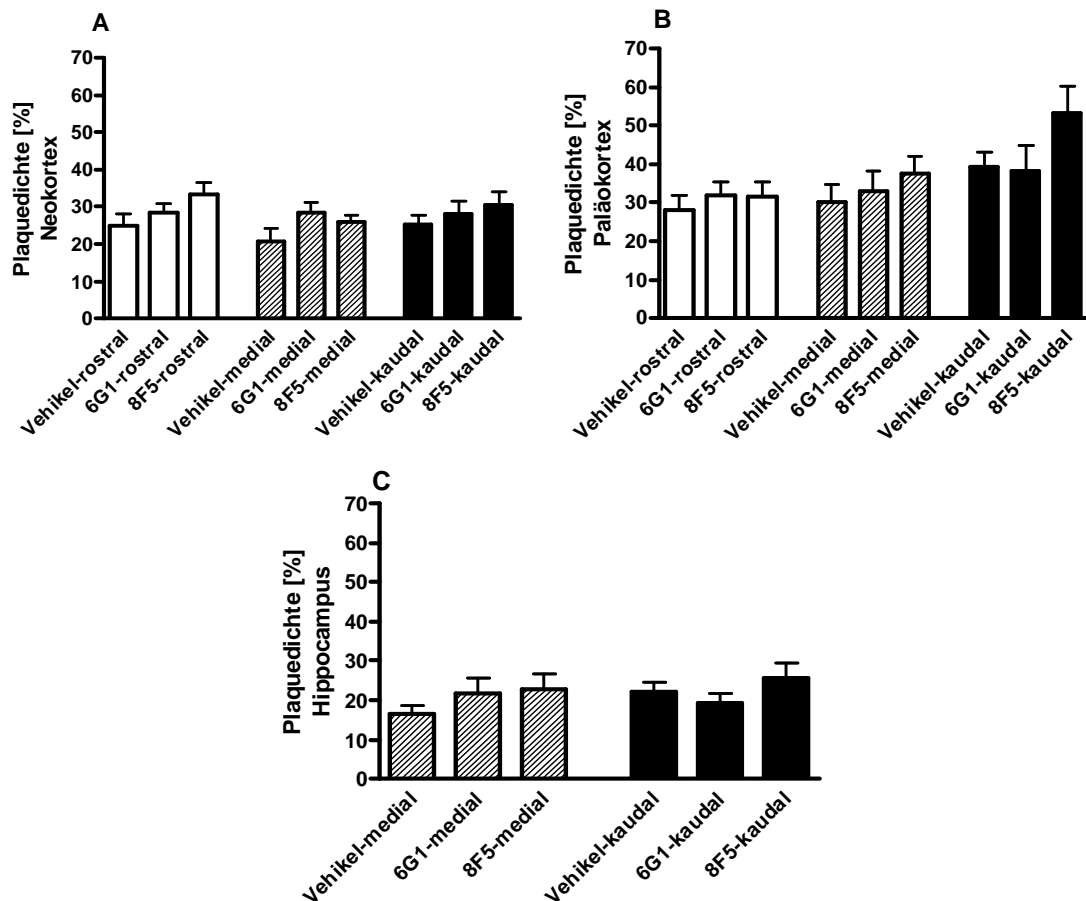


Abb. 22. Effekte der chronischen anti-A β Antikörperbehandlung auf die prozentuale Plaquesdichte in verschiedenen Arealen des Neo-, Paläokortex und Hippocampus von Tg2576-Mäusen

Die Daten sind mittlere Anteile der Gesamtfläche und Standardfehler, die von amyloiden Plaques bedeckt sind, nach Behandlung mit den anti-A β Antikörpern 6G1 ($n=8$) und 8F5 ($n=6$) oder dem Vehikel PBS ($n=8$) im Neokortex (A) und Paläokortex (B) separat für den rostralen, medialen und kaudalen Bereich und im Hippocampus (C) unterteilt in medialen und kaudalen Bereich. Die Überprüfung mit One Way ANOVA ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in den Bereichen des Neokortex und des Hippocampus ($p>0,05$), aber im Paläokortex ($p=0,0389$): indes ergab der post-hoc t-Test (Bonferroni) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Hinsichtlich der Aufklärung der abnormen hypointensen MRT-Signale bei alten Tg2576-Mäusen wurden Amyloid- und A β -Färbung durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass die thalamischen Bereiche negativ für lösliches oder fibrilläres A β waren. Im histologischen

Schnitt konnten kristalline Ansammlungen in den entsprechenden Regionen nachgewiesen werden (Abb. 23 A - C), die eine sandkornartige Struktur aufwiesen (Abb. 23 D, E). Die ebenfalls untersuchte Wildtyp-Maus mit hypointensem thalamischen MRT-Signal zeigt allerdings eher Hohlräume als kristalline Einschlüsse im histologischen Schnitt (Abb. 23 F). Allerdings können die fehlenden kristallinen Ablagerungen auch auf ein Herausfallen beim Schneideprozess zurückzuführen sein.

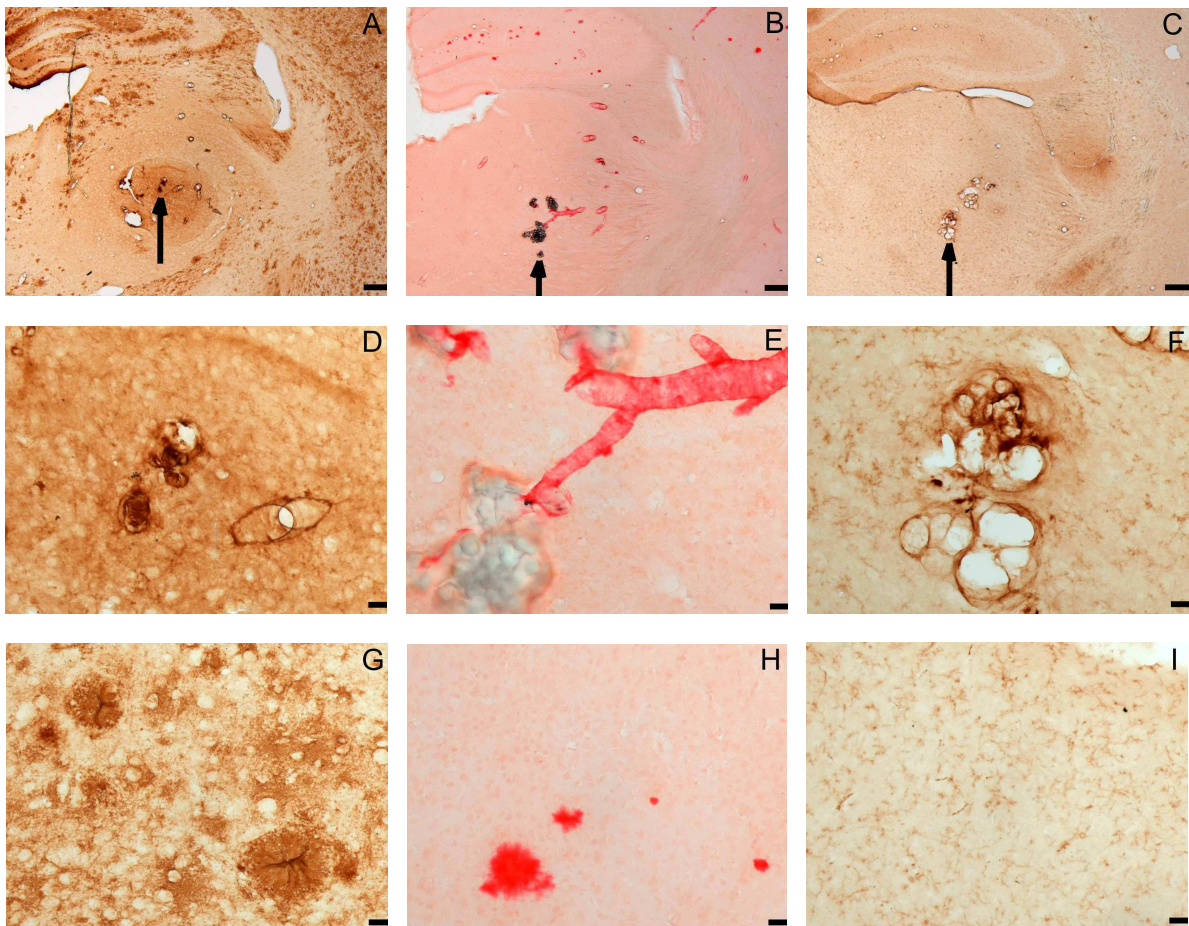


Abb. 23. Darstellung der amyloiden Färbungen in Transversalschnitten einer Tg2576-Maus und einer Wildtyp-Maus

A, D und G zeigen die A β -Färbung durch 6G1 bei einem transgenen Tier. B, E und H zeigen die Kongorot-Färbung an demselben transgenen Tier. C, F und I zeigen die A β -Färbung durch 6G1 bei einer Wildtyp-Maus. D, E und F zeigen eine Vergrößerung der abnormen hypointensen MRT-Signale aus dem thalamischen Bereich. G und H zeigen eine Vergrößerung von amyloiden Plaques aus dem Kortex einer Tg2576-Maus, wohingegen I eine Vergrößerung vom plaquefreien Kortex der Wildtyp-Maus zeigt. Maßstab: A/B/C=200 μ m, D/E/F/G/H/I=20 μ m.

Die Formation der kristallinen, thalamischen Ablagerungen weicht deutlich von einer typischen amyloiden, d.h. fettartigen, Plaquestruktur ab (Abb. 23 G, H; Abb. 24 A) und spricht gegen das Vorhandensein von A β in den kristallinen Einschlüssen. Weiterhin widerlegt die negative Kongorot-Färbung (Abb. 23 B) und die negative 6G1-Färbung für A β in der Wildtyp-Maus (Abb. 23 C, I) die Anwesenheit von A β in den kristallinen Ansamm-

lungen. Die Kongorot-Färbung verdeutlicht, dass amyloide Plaques bei Tg2576-Mäusen nur im Kortex bzw. im Hippocampus auftreten. Hingegen sind in den subkortikalen Bereichen nur Gefäßwände mit fibrillärem A β angefärbt. Eine Ruptur dieser Gefäßwände scheint im Zusammenhang mit den kristallinen Ablagerungen zu stehen (Abb. 23 E).

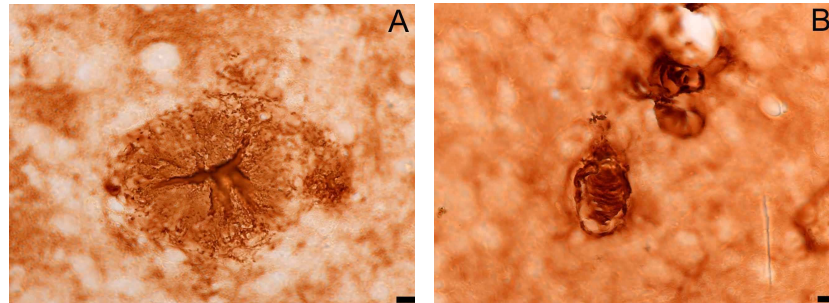


Abb. 24. Darstellung der unterschiedlichen Struktur von amyloiden Plaques und thalamischem Signal mittels A β -Färbung durch 6G1 in einer Tg2576-Maus

Die beiden Transversalschnitte zeigen einen deutlichen Unterschied in der Struktur. **A** zeigt die Struktur von amyloiden Plaques im Kortex, während **B** eine kristalline Struktur im Thalamus zeigt. Maßstab: A/B=10 μ m.

Die Auswertung der amyloiden Plaquetfärbungen ergab keine signifikante Reduzierung der prozentualen Plaquedichte durch eine chronische Behandlung mit anti-A β gerichteten Antikörpern. Im Gegenteil, die 8F5-Behandlung weist eine Tendenz für eine Erhöhung dieser Plaquedichte auf. Ferner konnte festgestellt werden, dass die hypointensen MRT-Signale nicht auf A β -Ablagerungen beruhen. Für eine weitere Analyse wurden zusätzliche Färbungen durchgeführt.

3.3.2. Nissl-Färbung

Als nächstes wurde in benachbarten Transversalschnitten eine Nissl-Färbung zur Darstellung der Zellen durchgeführt. Verwendet wurden Gehirnschnitte von neun transgenen Mäusen plus eine Wildtyp-Maus *mit* und fünf transgene Tieren *ohne* thalamisches MRT-Signal. Obwohl die Nissl-Färbung eine Übersichtsfärbung zur Anfärbung des gesamten Zellmaterials ist, konnte auch hiermit die Natur der Ablagerungen nicht festgestellt werden. Bestätigt werden konnte die kristalline, sandkornartige Struktur dieser Ablagerungen (Abb. 25).

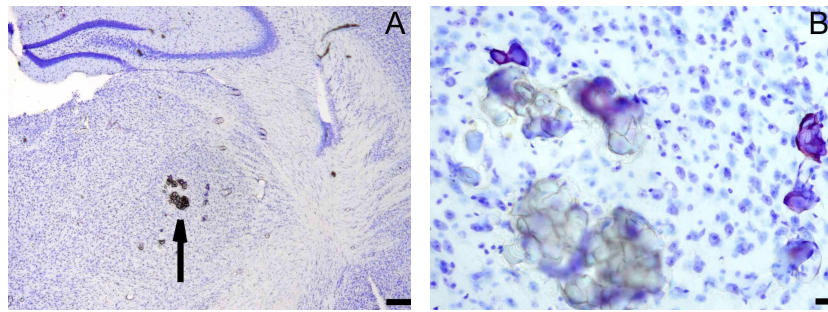


Abb. 25. Darstellung des thalamischen Signals mittels Nissl-Färbung in einer Tg2576-Maus

Die Transversalschnitte zeigen kristalline Ablagerungen im Thalamus. **B** ist eine Vergrößerung von **A**. Maßstab: A=200 μm , B=20 μm .

3.3.3. Kalziumnachweis

Der nächste Schritt zur Identifizierung der Ursache der MRT-Signale im Thalamus war die Durchführung einer Von Kossa-Kalziumfärbung. Hierbei wird Kalzium in Verbindung mit Karbonaten oder Phosphaten während der Färbung gegen Silberionen ausgetauscht und anschließend zu metallischem Silber reduziert. Für den Nachweis wurden transversale und horizontale Gehirnschnitte von neun transgenen Mäusen plus eine Wildtyp-Maus *mit* und von fünf transgene Tieren *ohne* thalamisches Signal im MRT verwendet.

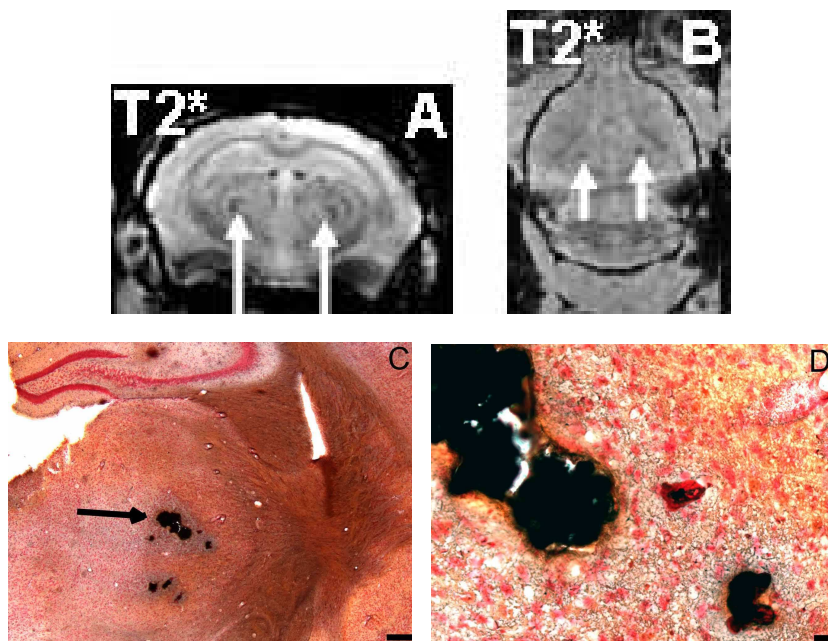


Abb. 26. Darstellung der thalamischen Kalzifizierung mittels MRT und Von Kossa-Färbung in einer Tg2576-Maus

A und **B** zeigen die Darstellung hypointenser Signale im transversalen und horizontalen T2*-gewichteten MRT (Pfeile). Die Transversalschnitte **C** und **D** zeigen eine positive Färbung von Kalziumablagerungen im Thalamus (Pfeil). **D** ist dabei eine Vergrößerung von **A**. Maßstab: C=200 μm , D=20 μm .

Die Kalziumfärbung ergab ein positives Ergebnis für alle kristallinen Ansammlungen im Thalamus (Abb. 26), sowohl bei Tg2576-Mäusen als auch bei der Wildtyp-Maus. Ferner traten die Kalzifizierungen in allen drei Behandlungsgruppen auf, viermal in der Vehikel-, zweimal in der 6G1- und dreimal in der 8F5-Gruppe. Bei sechs Tieren traten die Kalzifizierungen nur beim finalen MRT, aber nicht beim Basis-MRT auf. Interessant ist die Lokalisation der clusterartig organisierten Kalzifizierungen. Alle thalamischen Kalzifizierungen traten im Nucleus ventralis posterolateralis und im Nucleus ventralis posteromedialis im Bereich von 1,22 mm bis 2,46 mm nach Bregma auf (Paxinos und Franklin, 2001). Das Erscheinen der Kalzifizierungen in allen Behandlungsgruppen und in der Wildtyp-Maus sowie die Entwicklung der Kalzifizierungen während der Behandlungsperiode weisen eher auf einen altersbedingten als auf einen behandlungsbedingten Prozess hin.

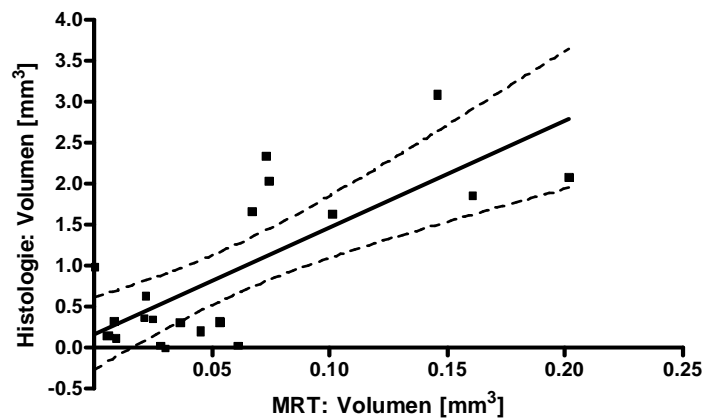


Abb. 27. Vergleich der mittels MRT und Histologie nachgewiesenen Größe der Kalziumablagerungen

Die Abbildung zeigt die individuellen Werte und die lineare Regressionsgerade der mittels MRT und histologischer Von Kossa-Färbung ermittelten Volumina der thalamischen Kalzifizierungen ($n=10$). Es wurden zehn transversale und zehn horizontale histologische Schnitte mit den entsprechenden T2*-gewichteten MRT-Bildern verglichen. Die Parameter waren signifikant korreliert (Korrelationskoeffizient $r=0,7583$; $p=0,0001$).

Für die Auswertung wurde das Volumen der thalamischen Ablagerung anhand der MRT-Bilder und der histologischen Aufnahmen ermittelt. Dazu wurden die Flächen dieser Einschlüsse gemessen, addiert und anschließend mit der jeweiligen Schnittdicke multipliziert. Der statistische Vergleich der beiden Volumina ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der MRT-Signalgröße und den Kalziumablagerungen in der Von Kossa-Färbung (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r=0,7583$; $p=0,0001$; Abb. 27). Obwohl die histologisch vermessenen Volumina größer ausfallen als die mittels MRT ermittelten Volumina weisen beide Methoden eine gute Übereinstimmung der detektierbaren Kalziumablagerungen auf.

Mit der Kalziumfärbung konnte die Natur der hypointensen thalamischen MRT-Signale geklärt werden. Die histologische Verifizierung ergab, dass die thalamischen MRT-Signale

kein lösliches oder fibrilläres A β und kein Eisen (0 %), aber Kalzium (100 %) enthalten. Die fünf Tiere ohne hypointenses MRT-Signal im Thalamus zeigten im Gegensatz dazu ein negatives Ergebnis bei der Kalziumfärbung (0 %). Die Tab. 12 zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse vom MRT und Histologie hinsichtlich der Detektion von Kalzium.

Färbung	MRT	Amyloide Plaques	A β	Eisen	Kalzium
Thalamisches Signal <i>n</i> =10	100 % (10/10)	0 % (0/10)	0 % (0/10)	0 % (0/10)	100 % (10/10)
Kein thalamisches Signal <i>n</i> =5	0 % (0/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)	0 % (0/5)

Tab. 12. Vergleich der MRT-Signale (T2*-gewichtet) mit verschiedenen histologischen Färbungen im Thalamus

In der Tabelle sind die Resultate der verschiedenen Untersuchungen prozentual und die Anzahl der Tiere mit den Ergebnissen im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Tiere (in Klammern) dargestellt.

3.4. Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung

Bei diesem Versuch sollte die Entstehung von induzierten Mikroblutungen *in vivo* mittels MRT verfolgt werden. Hierfür wurden acht Mäuse mit einer Mutation von humanen APP (APP/Lo) und acht Wildtyp-Mäuse mit dem anti-A β Antikörper (6G1) und sieben APP/Lo-Mäuse mit PBS über einen Zeitraum von zwölf Wochen behandelt. In den ersten vier Wochen wurde den Mäusen dreimal pro Woche je 0,5 mg Antikörper pro Tier appliziert. Nach diesen vier Wochen und drei MRTs (basale Messung und nach zwei und vier Wochen Behandlung) waren vier Tiere (17 %) verstorben. Aufgrund dessen wurde die Anzahl der Applikationen auf einmal pro Woche reduziert. Trotzdem waren zum Zeitpunkt der nächsten Tomographie, acht Wochen nach Behandlungsbeginn, weitere vier Tiere (insgesamt 34 %) verstorben. Nach weiteren vier Wochen wurde das vierte MRT durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war ein weiteres Tier verstorben (39 % der Gesamtanzahl). Die höchste Mortalitätsrate war in der Wildtypgruppe zu verzeichnen, gefolgt von der mit PBS behandelten Kontrollgruppe. Ein reiner Antikörper-effekt kann daher als Todesursache ausgeschlossen werden. Infolge der hohen Mortalitätsrate wurde die Behandlung nach dem vierten MRT abgebrochen. Bis zu diesem Moment hatte kein Tier eine mittels MRT detektierbare Mikroblutung entwickelt (Tab. 13).

	Basis-MRT	1. MRT	2. MRT	3. MRT	4. MRT	5. MRT	6. MRT
	Ohne Behandlung	Nach 2 Wochen	Nach 4 Wochen	Nach 8 Wochen	Nach 12 Wochen	Nach 7 Monaten	Nach 9 Monaten
Wt + 6G1	0/8	0/8	0/5	0/3	0/2	0/1	0/1
APP/Lo + 6G1	0/8	0/8	0/8	0/7	0/7	1/7	1/5
APP/Lo + PBS	0/7	0/7	0/6	0/5	0/5	0/5	1/2

Tab. 13. Darstellung der Anzahl der mittels MRT detektierten Mikroblutungen nach Behandlung mit dem anti-A β Antikörper 6G1 bei APP/Lo-Mäusen

In der Tabelle ist die Anzahl der Tiere mit Mikroblutungen im MRT zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlungsbeginn dargestellt. Durch die hohe Mortalität nahm die ursprüngliche Gruppengröße von 7-8 Mäusen stark ab und die Behandlung wurde nach zwölf Wochen abgebrochen. Die Daten zeigen die Anzahl der Tiere mit Mikroblutungen im Verhältnis zur Gesamtzahl der verbliebenen Tiere pro Gruppe. In zwei weiteren MRTs, sieben und neun Monate nach Behandlungsbeginn und vier bis sechs Monate nach Behandlungsende, traten die ersten Mikroblutungen auf.

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich Mikroblutungen eher altersabhängig entwickeln. Hierfür wurden die überlebenden APP/Lo-Mäuse zwei weitere Male einem MRT unterzogen. Sieben Monate nach der ersten Behandlung bzw. vier Monate nach Behandlungsabbruch betrug die Gruppengröße $n=1$ bei den Wildtyp-Mäusen, $n=7$ bei den 6G1 behandelten APP/Lo-Mäusen und $n=5$ bei den PBS behandelten APP/Lo-Mäusen. Die Mäuse waren zu diesem Zeitpunkt 20-22 Monate alt. Anhand der MRT-Bilder konnte nur eine Mikroblutung im Kortex einer 6G1 behandelten APP/Lo-Maus nachgewiesen werden (Tab. 13). Nach zwei weiteren Monaten (sechs Monate nach Behandlungsende) wurde das zweite MRT durchgeführt. Innerhalb der zwei Monate reduzierte sich die Gruppengröße weiter auf: $n=1$ bei den Wildtypen, $n=5$ bei den 6G1 behandelten APP/Lo-Mäusen und $n=2$ bei den PBS behandelten APP/Lo-Mäusen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Mäuse 22-24 Monate alt. Bei der Auswertung konnten insgesamt zwei Mikroblutungen nachgewiesen werden (Tab. 13; Abb. 28). Eine Mikroblutung war im Kortex bei einer PBS behandelten APP/Lo-Maus neu aufgetreten, die zweite Mikroblutung konnte schon im vorherigen fünften MRT gezeigt werden.

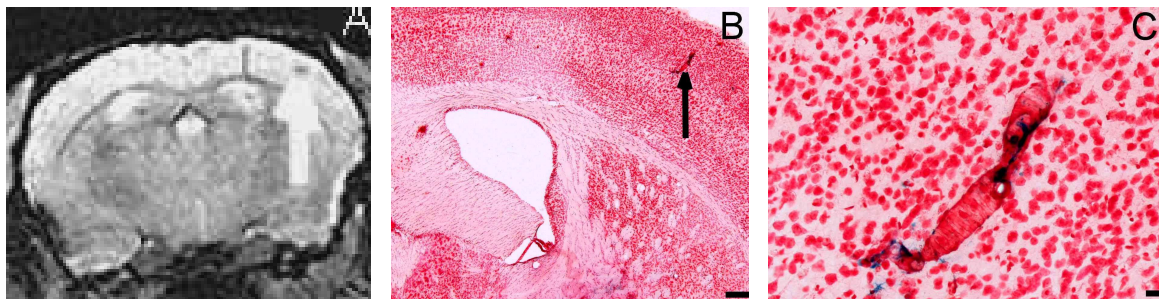


Abb. 28. Darstellung einer Mikroblutung bei einer 22 Monate alten APP/Lo-Maus

Die Transversalschnitte zeigen eine Mikroblutung im T2*-gewichteten MRT (A) und in der Preußisch-Blau-Färbung (B/C). C ist eine Vergrößerung von B. Maßstab: B=200 μ m, C=20 μ m.

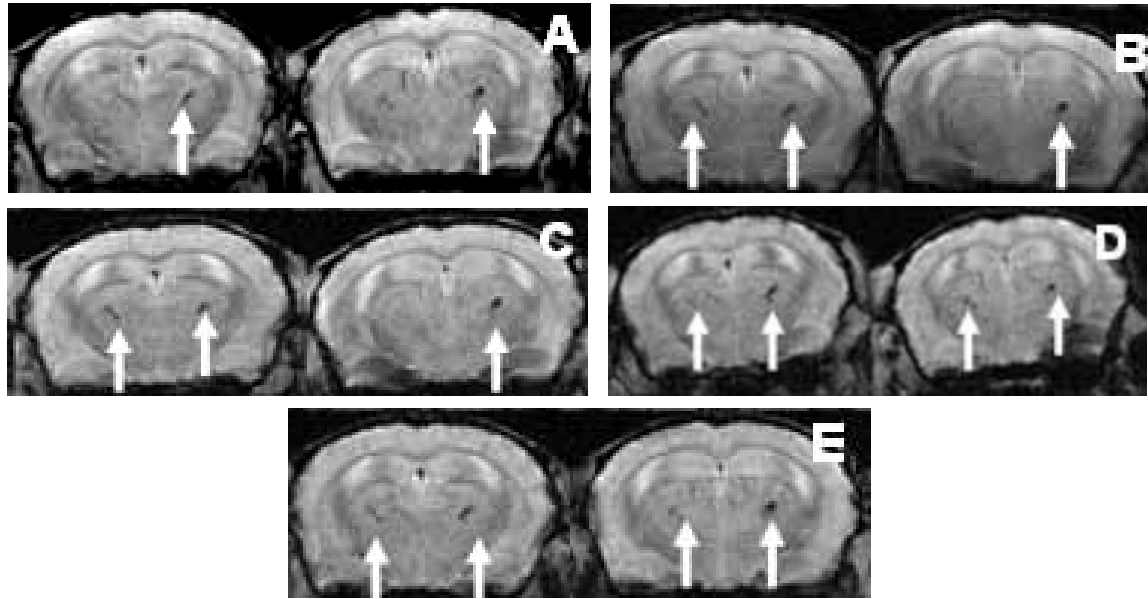


Abb. 29. Darstellung der Entwicklung einer Kalzifizierung bei einer APP/Lo-Maus mittels T2*-gewichteter MRT

Die Transversalschnitte zeigen Kalzifizierungen (Pfeile) mittels T2*-gewichteter MRT in verschiedenen Alterstufen: **A**=14 Monate alt, **B**=14,5 Monate alt, **C**=15 Monate alt, **D**=16 Monate alt, **E**=17 Monate alt. A zeigt zwei Kalzifizierungen, B drei und ab D sind vier Kalzifizierungen erkennbar.

Aufgrund des Ausbleibens von induzierten Mikroblutungen bei diesem Versuch konnte keine statistische Auswertung des *in vivo* MRT-Nachweises zur Beobachtung der Entstehung von Mikroblutungen erfolgen. Aber es wurden bei den APP/Lo-Mäusen, ebenso wie bei den Tg2576-Mäusen aus Versuch 3.2.1, als Nebeneffekt bilaterale Kalzifizierungen im thalamischen Bereich festgestellt (Abb. 29 A - E). Bei drei Tieren traten diese Kalzifizierungen schon im Alter von 13-15 Monaten auf. Anhand der MRT-Bilder konnte nachvollzogen werden, dass sich mit zunehmendem Alter die Anzahl der Tiere mit Kalzifizierungen erhöht. Ferner konnte festgestellt werden, dass früh aufgetretene Kalzifizierungen in aufeinander folgenden MRT-Bildern zunehmen, aber auf den Bereich der thalamischen Nuklei beschränkt bleiben (Tab. 14).

Insgesamt konnten sechs Gehirne von APP/Lo-Mäusen histologisch mittels Preußisch-Blau-Färbung aufgearbeitet werden. Die Ergebnisse dieser sechs Tiere hinsichtlich der Anzahl von Mikroblutungen wurden mit den Ergebnissen vom letzten MRT verglichen. Ähnlich wie bei den antikörperbehandelten Tg2576-Mäusen sind Mikroblutungen erst ab einer Größe von 60 μm in MRT-Bildern ersichtlich. Von den aufgearbeiteten Tieren wiesen nur zwei Tiere eine Mikroblutung im MRT auf. In der Preußisch-Blau-Färbung hingegen wiesen vier Tiere zwischen 1-3 Mikroblutungen auf. Indes waren diese Mikroblutungen kleiner als 60 μm und somit im MRT nicht detektierbar. Nur zwei der Tiere wiesen eine Mikroblutung größer als 60 μm auf und diese waren in den MRT-Bildern erkennbar (Abb. 28).

	Basis-MRT	1. MRT	2. MRT	3. MRT	4. MRT	5. MRT	6. MRT
<i>Alter</i>	13-15 <i>Monate</i>	13,5-15,5 <i>Monate</i>	14-16 <i>Monate</i>	15-17 <i>Monate</i>	16-18 <i>Monate</i>	20-22 <i>Monate</i>	22-24 <i>Monate</i>
Wt + 6G1	2/8	4/8	4/5	2/3	1/2	1/1	1/1
APP/Lo + 6G1	1/8	2/8	3/8	2/7	3/7	5/7	4/5
APP/Lo + PBS	0/7	2/7	3/6	2/5	2/5	3/5	1/2

Tab. 14. Darstellung der Anzahl der hypointensen Signale im MRT (oben als Kalzifizierungen identifiziert) in APP/Lo-Mäusen

Das Auftreten von Kalzifizierungen zu den verschiedenen Zeitpunkten der MRTs bzw. dem entsprechenden Tieralter ist dargestellt. Die Werte sind die Anzahl derjenigen Tiere mit Kalzifizierungen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Tiere pro Gruppe. Bei drei APP/Lo-Mäusen traten die Kalzifizierungen schon im basalen MRT, d.h. im Alter von 13-15 Monaten auf. Die Anzahl der Kalzifizierungen stieg stetig mit zunehmendem Alter der Tiere.

Durch die Langzeitstudie zur *in vivo* Beobachtung der Entwicklung von Mikroblutungen mittels MRT konnte gezeigt werden, dass dies in APP transgenen Mäusen nicht immer möglich ist. Der Grund hierfür war, dass bei den APP/Lo-Mäusen im Alter von 13-20 Monaten keine Mikroblutungen durch die chronische Applikation von 6G1 induziert werden konnten. Allerdings konnte als Nebeneffekt das altersabhängige Vorkommen von Kalzifizierungen anhand von MRT-Bildern bestätigt werden.

3.5. Nachweis von amyloiden Plaques mittels MRT

Eine weitere Frage dieser Arbeit war, ob neben den Mikroblutungen auch amyloide Plaques durch MRT *in vivo* detektiert werden können. Außerdem sollte getestet werden, ob eine therapeutische Beeinflussung der Plaquesgröße und -zahl durch eine chronische Applikation von anti-A β Antikörpern mittels MRT überwacht werden kann.

3.5.1. Nachweis von amyloiden Plaques ohne zusätzliche Markierung

Basierend auf den Veröffentlichung von Jack et al. (2004) und Lee et al. (2004) wurde im ersten Experiment der *in vivo* MRT-Plaquesnachweis ohne eine weitere Markierung der amyloiden Plaques durchgeführt. Dazu wurde das Auflösungsvermögen des T2*-gewichteten MRTs durch eine Modifizierung der Tomographieparameter erhöht. Verändert wurden u.a. die Bildmatrix, das Messfeld (FOV) und die Schnittdicke. Untersucht wurden sechs 21 Monate alte Tg2576-Mäuse.

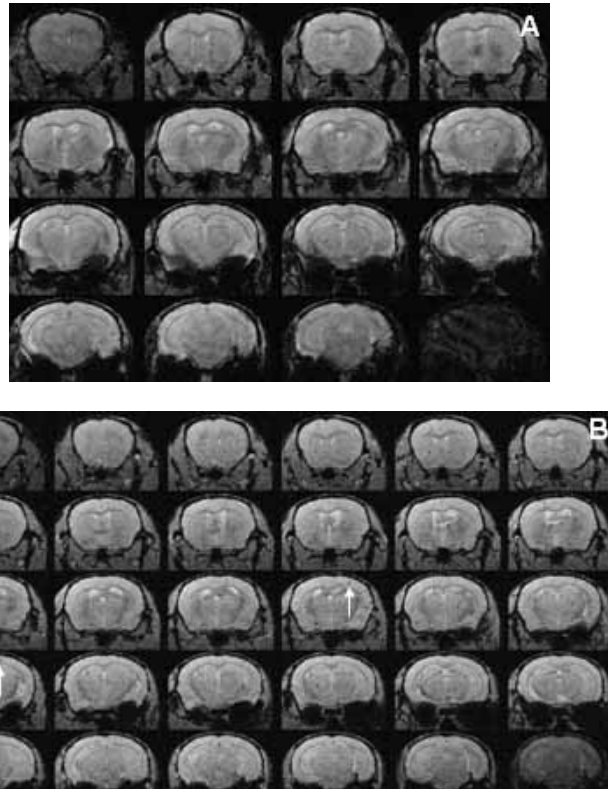


Abb. 30. Versuch des Plaquenachweises mittels T2*-gewichteter MRT bei einer Tg2576-Maus

Die transversalen Abbildungen zeigen den Versuch des Plaquenachweises mittels T2*-gewichteter MRT bei einem 21 Monate alten Tier. Bei **A** beträgt die Schnittdicke 400 µm, wohingegen **B** eine Schnittdicke von 200 µm aufweist. In **B** konnten zwei Mikroblutungen (Pfeile), aber keine Plaques nachgewiesen werden.

Die veränderten Tomographieparameter zur Erhöhung des Auflösungsvermögens brachten bei keinem Tier ein Ergebnis hinsichtlich des *in vivo* Plaquenachweises mittels T2*-gewichteter MRT. Aber es konnten mit gesteigertem Auflösungsvermögen geringfügig mehr Mikroblutungen nachgewiesen werden als mit normalen Auflösungsvermögen (Abb. 30). Der Grund dafür kann die verstärkte Abbildung von Magnetfeldinhomogenitäten in MRT-Aufnahmen mit erhöhter Auflösung sein. Die Mikroblutungen konnten histologisch verifiziert werden.

3.5.2. Nachweis von amyloiden Plaques mittels FSB-Markierung

Nachdem ohne Markierung eine Plaquedarstellung mittels *in vivo* MRT nicht möglich war, wurde ein *in vivo* verträgliches Kontrastmittel verwendet. Das Kontrastmittel FSB ((E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)stryrylbenzen) ist ein Derivat des Kongorots. Es bindet daher mit einer hohen Affinität an fibrilläre Plaquestrukturen. Durch das enthaltene Fluormolekül ist FSB mittels einer speziellen Spule detektierbar (Higuchi et al., 2005; Sato et al., 2004).

3.5.2.1. Histologische Überprüfung der FSB-Plaquerbindung

Im ersten Teil des Versuchs des *in vivo* MRT-Plaquenachweises mittels FSB, wurde die Bindungsfähigkeit von FSB an amyloide Plaques untersucht. Dazu wurden sechs Transversalschnitte von neunzehn Monate alten Tg2576-Mäusen verwendet.

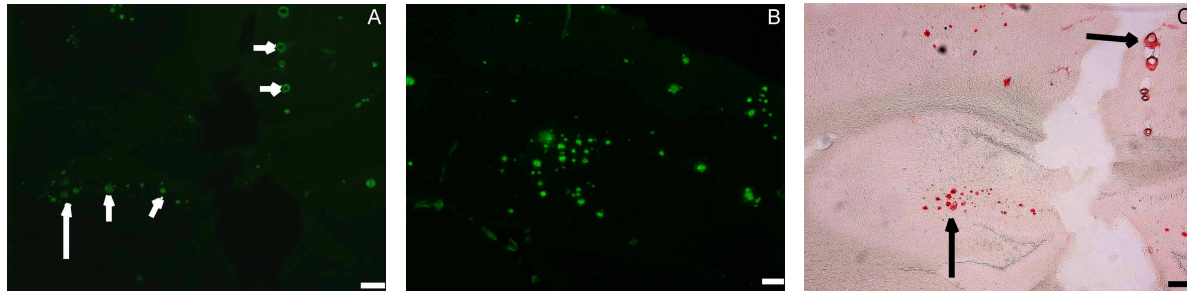


Abb. 31. Darstellung der FSB-Färbung für amyloide Plaques bei einer 22 Monate alten Tg2576-Maus

In den Transversalschnitten sind amyloide Plaques im Hippocampus und im Kortex und fibrilläres A β in Gefäßwänden zu erkennen (Pfeile). **A** und **B** zeigen die FSB-Färbung, während **C** eine Kongorot-Färbung an derselben Stelle wie in **A** aufzeigt. **B** ist eine Vergrößerung der hippocampalen amyloiden Plaques aus **A** (linker, größter Pfeil). Maßstab: A/C=100 μ m, C=50 μ m.

Die mikroskopische, qualitative Beurteilung der beiden Färbungen ergab bei allen sechs Tieren ein übereinstimmendes Bild hinsichtlich der Anfärbung von parenchymalen amyloiden Plaques und vaskulären fibrillärem A β (Abb. 31). FSB weist also eine ähnliche Bindungsfähigkeit wie Kongorot auf.

3.5.2.2. Bestimmung des Detektionslevels mittels MRT

Im Folgenden wurden die Detektionslevel von FSB im MRT bestimmt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von FSB in destilliertem Wasser gelöst und in 5 ml Glasflaschen im MRT gescannt. Für das MRT wurde eine spezielle Fluordetektionsspule von Bruker verwendet.

Im Protonenkanal des MRTs konnten alle verschieden konzentrierten FSB-Lösungen dargestellt werden (Abb. 32 B). Im Gegensatz dazu war die Detektion im Fluorkanal des MRTs von der FSB-Konzentration abhängig. Hierbei konnte nur die Konzentration von 1 M FSB sehr gut nachgewiesen werden (Abb. 32 A). Alle geringer konzentrierten FSB-Lösungen (100 mM und weniger) zeigten kein Signal im Fluorkanal. Auch ein Versuch zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erbrachte kein verbessertes Detektionslevel.

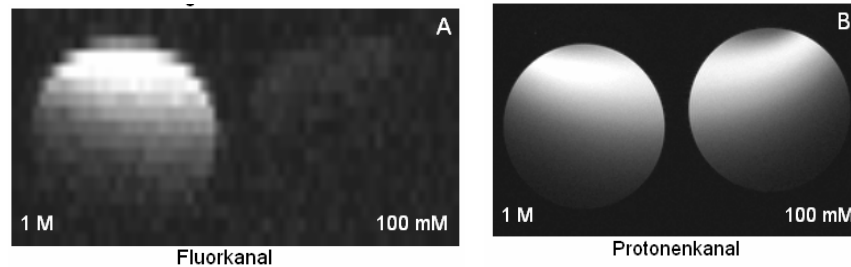


Abb. 32. Darstellung des Detektionslevels von FSB mittels Fluor- und Protonenkanal beim MRT

Die Abbildungen zeigen Schnitte durch Glasflaschen mit einer definierten FSB-Konzentration im Fluor- (A) und im Protonenkanal (B). Die Konzentration von 1 M FSB (linke Bildseiten) ist in beiden Kanälen erkennbar. Dahingegen ist die Konzentration von 100 mM FSB (rechte Bildseiten) im Protonenkanal ebenfalls gut sichtbar, im Fluorkanal hingegen nicht erkennbar.

3.5.2.3. Ex vivo Plaquetfärbung mittels FSB-Markierung

Obwohl FSB im Fluorkanal nur bei der hohen Konzentration von 1 M FSB detektiert werden konnte, wurde eine *ex vivo* Plaquetfärbung mittels FSB-Markierung versucht. Der Grund hierfür war die Vermutung, dass eine Bindung von FSB an amyloide Plaques zu einer Akkumulation von FSB führen könnte und dadurch eventuell eine Detektion mittels MRT ermöglicht würde. Für den Nachweis wurden zwei Tiere verwendet, eine Tg2576-Maus und eine Wildtyp-Maus. Beide Tiere waren zu diesem Zeitpunkt vierzehn Monate alt. Die Gehirne der Tiere wurden extrahiert und *ex vivo* in 2 % FSB inkubiert.

Die Tomographien zum *ex vivo* FSB-Nachweis von amyloiden Plaques wurden ein, drei, fünf und sieben Tage nach Inkubationsbeginn durchgeführt. Bei keiner MRT-Aufnahme konnten Plaques nachgewiesen werden. Obwohl eine Darstellung der beiden Gehirne durch die T2- und T2*-gewichteten MRT-Kontraste möglich war (Abb. 33 A, B), konnte im Fluorkanal bei beiden Tieren kein Signal detektiert werden (Abb. 33 C). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Qualität der *ex vivo* MRT-Aufnahmen deutlich schlechter ausfiel als bei *in vivo* Aufnahmen. Die Ursache war vermutlich eine Dehydrierung der Gehirne im Verlaufe des MRTs, trotz einer Einbettung der Gehirne in Agarose. Ein Merkmal diese Dehydrierung ist der unregelmäßige Kortex beim T2*-gewichteten MRT.

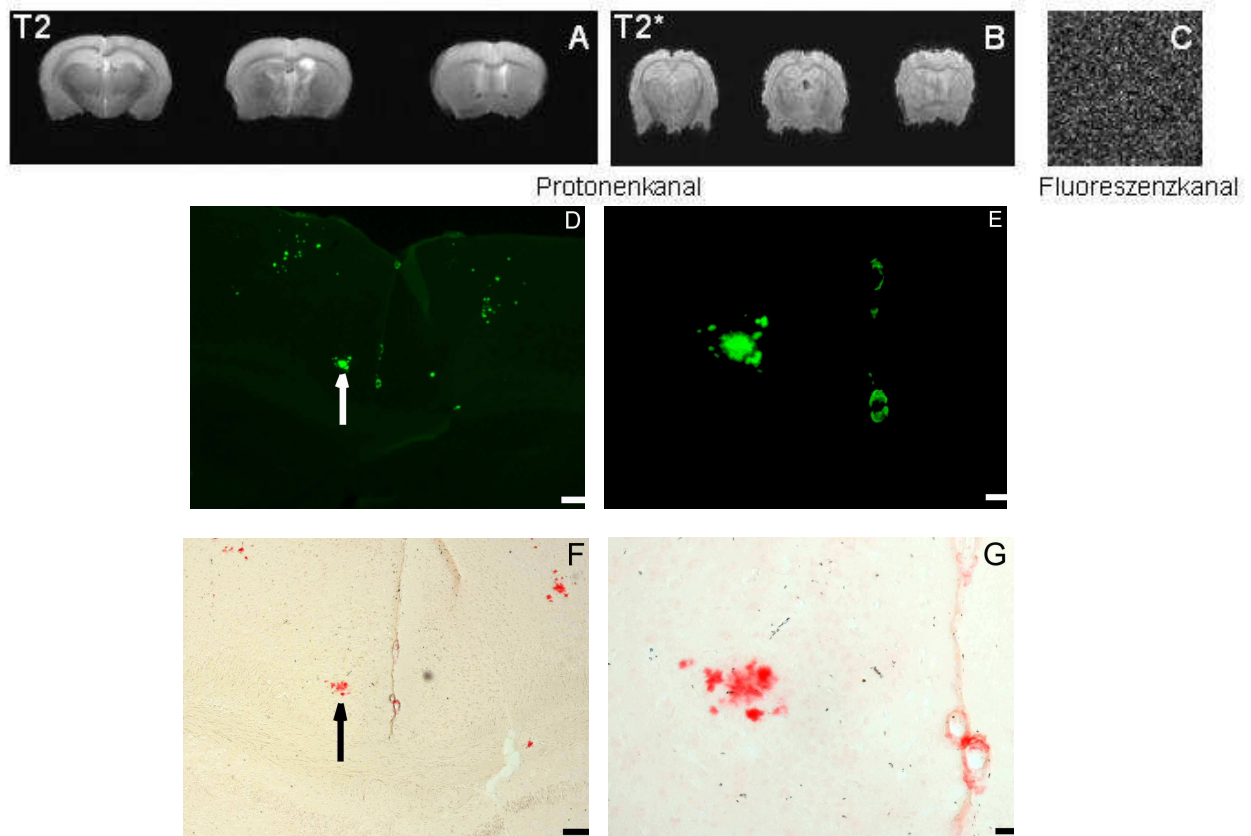


Abb. 33. Darstellung der *ex vivo* Markierung mit FSB bei einer 14 Monate alten Tg2576-Maus

A, B und C zeigen transversale MRT-Aufnahmen. Dabei stellen A und B die verschiedenen Darstellungskontraste (T2, T2*) im Protonenkanal dar. Anhand dieser MRT-Bilder konnten keine Plaques festgestellt werden. Bei C, welches im speziellen Fluoreszenzkanal aufgenommen wurde, konnte keinerlei Signal erkannt werden. Die histologische Verifizierung der Plaques erfolgte durch Fluoreszenzanregung in Transversalschnitten, nachdem zuvor das gesamte Gehirn *ex vivo* in FSB inkubiert wurde (D) und mittels Kongorotfärbung (F). In beiden Abbildungen sind Plaques mit gleicher Lokalisation erkennbar. E und G sind Vergrößerungen der pfeilmarkierten Plaques in D und E. Maßstab: D/F=100 μ m, E/G=20 μ m.

Die nachfolgende histologische Aufarbeitung ergab, dass eine Markierung der amyloiden Plaques durch die *ex vivo* Färbung der Gehirne mit FSB erfolgreich war (Abb. 33 D, E). Die mit FSB markierten amyloiden Plaques konnten im Kortex und Hippocampus der Tg2576-Maus lokalisiert werden. Der Kortex und Hippocampus der Wildtyp-Maus zeigten keine Plauefärbung. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei der Kongorot-Färbung festgestellt werden (Abb. 33 F, G). Eine 2 % FSB-Lösung ist also durchaus in der Lage Gehirngewebe zu penetrieren und Plaques zu markieren. Allerdings war die resultierende Konzentration von FSB im Gewebe, auch nach Akkumulation in Plaques, zu gering für ein detektierbares MRT-Signal.

3.5.2.4. In vivo Plaquetfärbung mittels FSB-Markierung

Der letzte Teil der Untersuchung zum Plaquenachweis im MRT war die *in vivo* Markierung mit FSB. Hierbei erfolgte die Markierung durch eine fünfstündige Infusion von 2 % FSB bei zwei 25 Monate alten Tg2576-Mäusen. Allerdings verstarb ein Tier während der Infusion. Nach einer zweistündigen Wartephase wurde die Tomographie des verbliebenen Tieres durchgeführt.

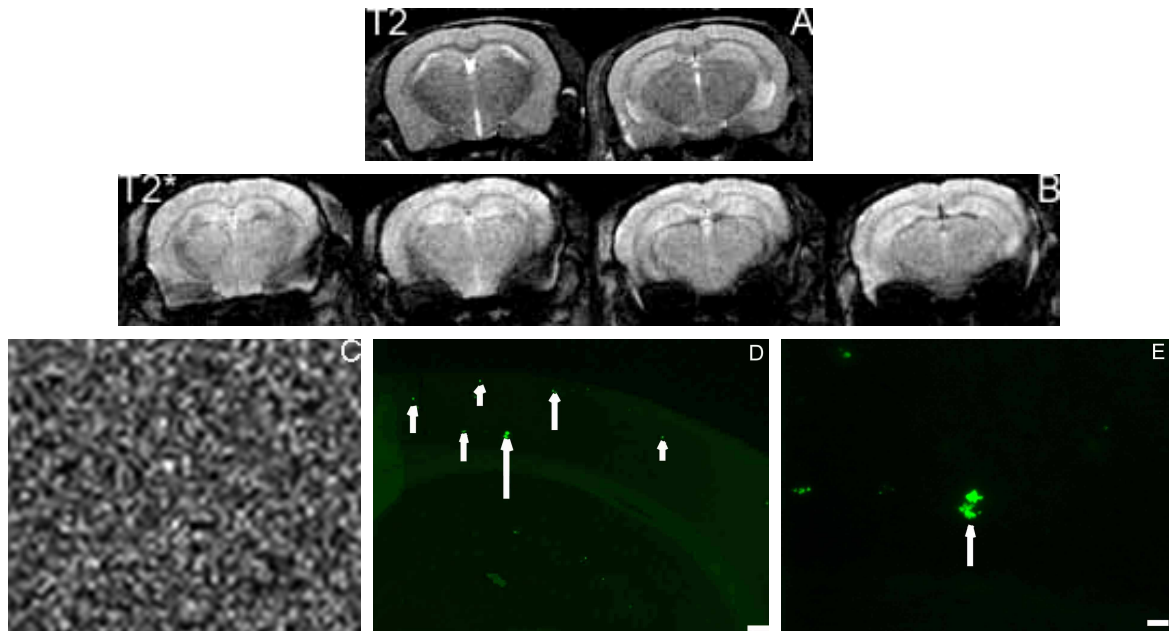


Abb. 34. Darstellung der *in vivo* Markierung mit FSB im MRT bei einer 25 Monate alten Tg2576-Maus

A, B und C zeigen transversale MRT-Aufnahmen. Dabei stellen A und B die verschiedenen Darstellungskontraste (T2, T2*) im Protonenkanal dar. Anhand dieser MRT-Bilder konnten keine Plaques festgestellt werden. Bei C, welches im speziellen Fluorkanal aufgenommen wurde, konnte keinerlei Signal erkannt werden. Die histologische Verifizierung erfolgte in Transversalschnitten nach der *in vivo* FSB-Markierung des gesamten Gehirns (D/E). Im Kortex sind fluoreszierende amyloide Plaques erkennbar (Pfeile). E ist eine Vergrößerung von D (größter Pfeil). Maßstab: D=100 μ m, E=50 μ m.

Bei der durchgeführten Tomographie zum *in vivo* FSB-Nachweis von amyloiden Plaques konnte kein Ergebnis erzielt werden. Wiederum war eine Darstellung des Gehirns im Protonenkanal durch die T2- und T2*-gewichteten MRT-Kontraste möglich (Abb. 34 A, B), aber im Fluorkanal konnte kein Signal detektiert werden (Abb. 34 C). Die nachfolgende histologische Verifizierung ergab, dass eine FSB-Markierung von amyloiden Plaques stattgefunden hat. Allerdings erscheint die Anzahl der durch FSB dargestellten kortikalen amyloiden Plaques für eine 25 Monate alte Tg2576-Maus sehr gering. Eine mögliche Ursache hierfür könnte ein ungenügender Transport von FSB durch die Blut-Hirn-Schranke sein.

Obwohl FSB generell eine gute Bindungsfähigkeit an fibrilläre A β -haltige Strukturen der Plaques besitzt, konnte die Detektion von *in vivo* verträglichen FSB-Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Basierend auf den hier gezeigten Resultaten scheint die MRT-Sensitivität für den Nachweis von amyloiden Plaques nicht ausreichend zu sein.

3.6. Einfluss einer chronischen A β -Antikörperbehandlung auf den Metabolismus

Bei diesem Experiment wurde untersucht, ob eine chronische Behandlung mit einem gegen A β gerichteten monoklonalen Oligomer Antikörper den neuronalen Metabolismus von siebzehn Monate alten Tg2576-Mäusen beeinflusst.

3.6.1. PET-Untersuchung mit ^{18}F FDG

Eine *in vivo* Studie über den Einfluss einer passiven Immunisierung auf den Glukoseverbrauch, als Maß für neuronale Aktivität, wurde bei Tg2576-Mäusen mittels PET durchgeführt (Abb. 35). Hierfür wurde den Tieren der anti-A β Oligomer Antikörper A-887755 alle fünf Tage über einen Zeitraum von 45 Tagen verabreicht. Insgesamt wurden 22 transgene Tiere und 22 Wildtyp-Mäuse untersucht. Für die Auswertung des neuronalen Glukoseverbrauchs wurde die ^{18}F FDG-Aktivität (2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose) im Gehirn ermittelt. Anschließend erfolgte die Berechnung des SUV (Standard Uptake Volume).

Zur Bestimmung der neuronalen ^{18}F FDG-Aktivität wurden zwei Tomographien durchgeführt, eine Tomographie vor und eine nach der Behandlungsperiode. Die quantitative Auswertung der SUV-Ergebnisse der Basistomographie ergab eine signifikant höhere Stoffwechselaktivität der transgenen Tieren gegenüber den Wildtyp-Mäusen (Abb. 36). Der zweiseitige, ungepaarte t-Test wies eine signifikant höhere ^{18}F FDG-Aktivität bei den transgenen Tieren auf ($p=0,0004$).

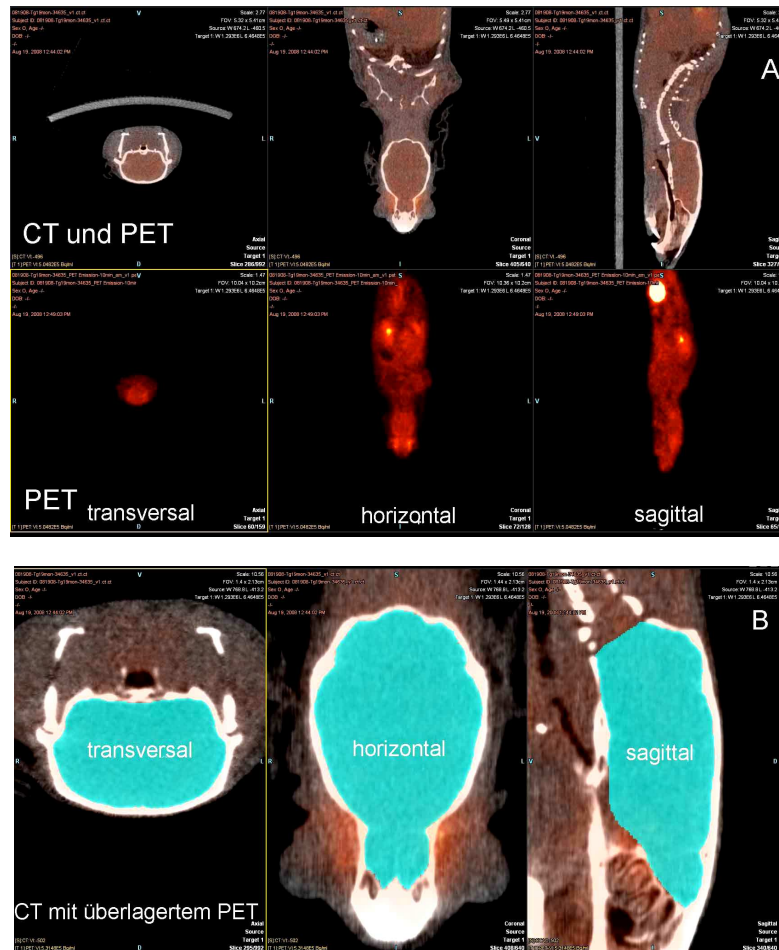


Abb. 35. Darstellung von ^{18}F FDG mittels PET bei einer 19 Monate alten Tg2576-Maus

Beide Abbildungen zeigen eine quantitative Bestimmung der ^{18}F FDG-Aktivität mittels Inveon Research Workplace-Software in transversalen, horizontalen und sagittalen Schnitten. **A** zeigt die CT-Bilder mit überlagerter ^{18}F FDG-Aktivität (oben) und die Verteilung von ^{18}F FDG im gesamten Körper (unten). **B** zeigt ein vergrößertes CT-Bild des Gehirns, ebenfalls mit überlagerter ^{18}F FDG-Aktivität. Anhand des CT-Bildes wurde eine ROI (Region of Interest) erstellt.

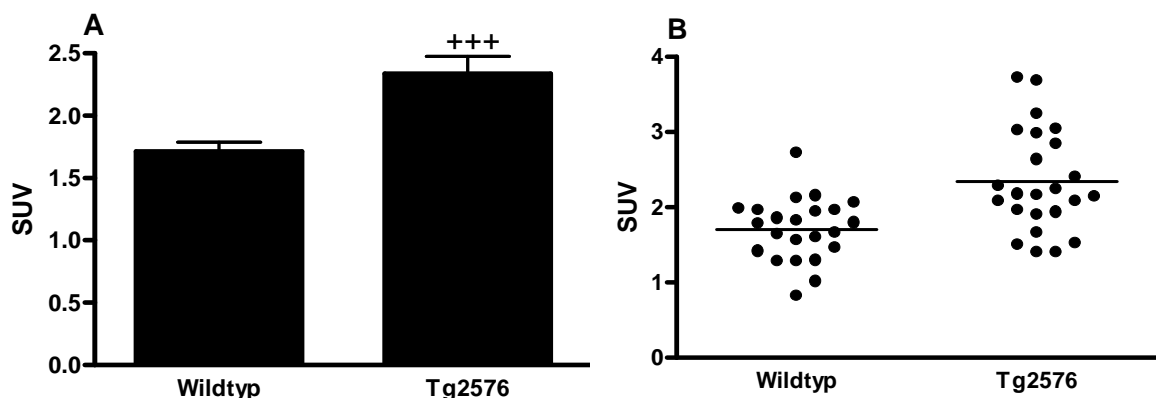


Abb. 36. Darstellung der unterschiedlichen ^{18}F FDG-Aktivität bei Tg2576- und Wildtyp-Mäusen

A zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der mittels PET ermittelten und anschließend normalisierten ^{18}F FDG-Aktivitäten (SUV) bei siebzehn Monate alten Tieren (n=22). **B** zeigt die Verteilung individueller Tiere und den Mittelwert. Die Überprüfung mit einem zweiseitigen, ungepaarten t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p=0,0004).

Auf die Basistomographie folgend wurde die chronische Applikation des Antikörpers begonnen. Dazu wurden sowohl die transgene Gruppe als auch die Wildtypgruppe jeweils unterteilt. Daraus ergaben sich wie folgt die einzelnen Gruppen: Wildtypkontrollgruppe, Wildtypantikörpergruppe, transgene Kontrollgruppe und transgene Antikörpergruppe. Zur Überwachung des Gesundheitszustandes wurden in diesem Zeitraum die Körpergewichte der Tiere kontrolliert (Abb. 37). Es konnte festgestellt werden, dass die Gewichte im Zeitraum von 45 Tagen stabil waren. Ferner wiesen die Wildtyp-Mäuse ein konstant höheres durchschnittliches Gewicht als die Tg2576-Mäuse auf, unabhängig von der Behandlung. Zwei Tiere verstarben während der chronischen Antikörperbehandlung. Da sowohl bei den antikörperbehandelten Wildtyp-Mäusen als auch in der Wildtyp Kontrollgruppe ein Tier verstorben ist, kann ein Einfluss der Antikörperapplikation auf die Mortalität ausgeschlossen werden.

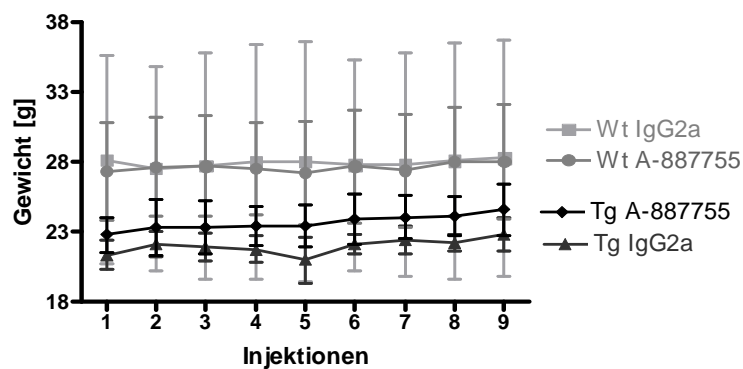


Abb. 37. Gewichtsentwicklung der Tg2576- und Wildtyp-Mäuse während der passiven Immunisierung

Dargestellt sind die mittleren Gewichte und Standardfehler während der 45-tägigen Behandlung von vier Gruppen: Wildtypkontrollgruppe (Quadrate), Wildtypantikörpergruppe (Kreise), transgene Kontrollgruppe (Dreiecke) und transgene Antikörpergruppe (Rauten). Am ersten Applikationstag betrug die Gruppengröße in allen vier Gruppen $n=11$. Zwei Tiere verstarben während der Behandlung, so dass am Ende in der Wt IgG2a-Gruppe und in der Wt A-887755-Gruppe jeweils $n=10$ Tiere vorhanden waren.

Am Tage der finalen Tomographie verstarben weitere fünf Tiere. Der Tod trat direkt nach der Anästhesie oder während der ^{18}FDG -Aufnahmephase ein.

Die quantitative Auswertung der finalen SUV-Ergebnisse mittels Two Way ANOVA ergab einen Antikörpereffekt. Mit einem nachfolgenden post-hoc t-Test konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen festgestellt werden ($p>0,05$; Abb. 38 A). Nach einer neunmaligen chronischen Applikation des anti-A β Oligomer Antikörpers A-887755 traten keine signifikant unterschiedliche ^{18}FDG -Aktivität im Vergleich mit der Kontrolle IgG2a auf. Ein transgener Effekt, wie bei den siebzehn Monate alten Tieren gezeigt, konnte bei den neunzehn Monate alten Tieren nicht mehr nachgewiesen werden.

Vergleicht man die finalen ^{18}FDG -Aktivitäten der einzelnen Gruppen mit den entsprechenden Basiswerten (Abb. 38 B), können signifikante Unterschiede festgestellt werden. Der angewandte zweiseitige, gepaarte t-Test ergab eine signifikant verminderte ^{18}FDG -Aktivität der transgenen Gruppen gegenüber ihren entsprechenden Basiswerten. Dabei fällt der Aktivitätsabfall in der transgenen Antikörpergruppe stärker aus als in der transgenen Kontrollgruppe ($p=0,0021$ und $p=0,0408$). Dieser Aktivitätsabfall kann ebenfalls bei einem gruppenweisen Vergleich der Basis- und der finalen ^{18}FDG -Aktivitäten der einzelnen Tiere gezeigt werden (Abb. 38 E, F). Auch wird verdeutlicht, dass die transgenen, antikörperbehandelten Tiere eine größere Abnahme der neuronalen Aktivität als die transgenen Kontrolltiere aufweisen. Allerdings fällt auf, dass die Basisaktivitäten in der transgenen Antikörpergruppe höher liegen als in der transgenen Kontrollgruppe mit einer Ausnahme: ein Tier der transgenen Kontrollgruppe weist eine hohe Basisaktivität und einen starken Aktivitätsabfall auf. Im Gegensatz zu den transgenen Tieren tritt bei den Wildtyp-Mäusen kein signifikanter Unterschied zwischen den Basisaktivitäten und den finalen Aktivitäten auf ($p>0,05$; Abb. 38 B). Bei einem gruppenweisen Vergleich der Basis- und der finalen ^{18}FDG -Aktivitäten der einzelnen Wildtyp-Mäuse treten nur marginale Veränderungen auf (Abb. 38 C, D).

Die Auswertung der PET-Bilder weist einen transgenen Effekt hinsichtlich der neuronalen ^{18}FDG -Aktivität bei siebzehn Monate alten Tieren nach. Dieser transgene Hypermetabolismus konnte aber bei neunzehn Monate alten Tieren nicht mehr gezeigt werden. Weiterhin konnte beim Vergleich der finalen Tomographie gegenüber der Basistomographie in beiden transgenen Gruppen ein Aktivitätsabfall nachgewiesen werden, wobei dieser in der antikörperbehandelten Gruppe stärker ausfiel als in der Kontrollgruppe.

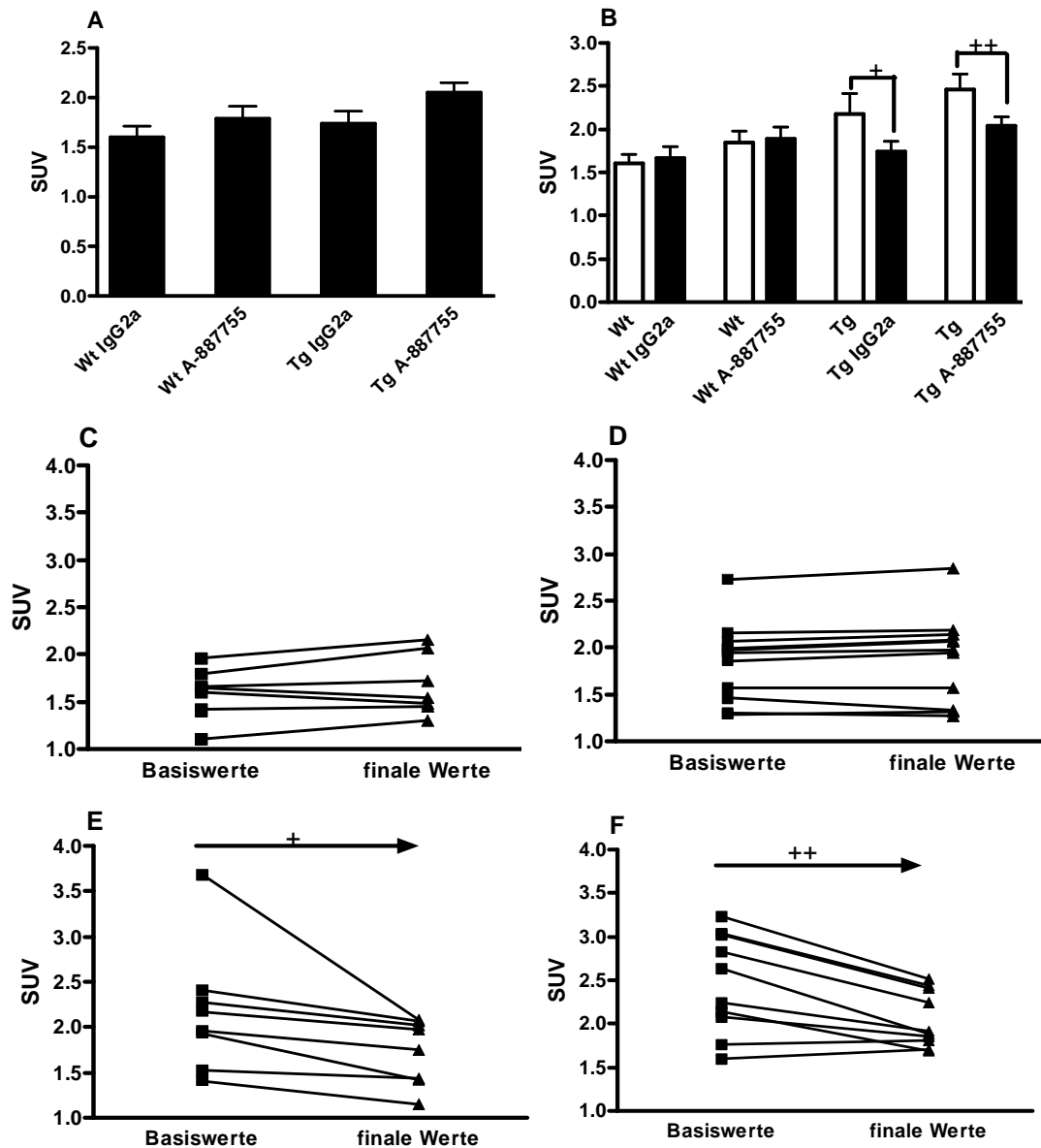


Abb. 38. Effekte der passiven Immunisierung auf die ^{18}F FDG-Aktivität bei Tg2576- und Wildtyp-Mäusen

A - F zeigen die normalisierte ^{18}F FDG-Aktivität (SUV) bei neunzehn Monate alten Tieren. Die Daten in A und B sind Mittelwerte und Standardfehler (n=8 in Wt IgG2a; n=11 in Wt A-887755; n=8 in Tg IgG2a; n=10 in Tg A-887755). A zeigt die SUV-Werte der finalen Tomographie. Die Überprüfung mittels einer Two Way ANOVA ergab einen Behandlungseffekt ($p < 0,05$). Beim Vergleich der Gruppen miteinander ergab der post-hoc t-Test keine signifikanten Unterschiede. B zeigt den gruppenweisen Vergleich der Basiswerte mit den entsprechenden finalen Werten. Ein zweiseitiger, gepaarter t-Test ergab einen signifikanten Abfall der finalen ^{18}F FDG-Aktivität gegenüber den Basiswerten in der Tg IgG2a-Gruppe ($p = 0,0408$) und in der Tg A-887755-Gruppe ($p = 0,0021$). C bis F zeigen die ^{18}F FDG-Aktivitäten der einzelnen Tiere im Basis-PET und im finalen PET. Die Abbildung der einzelnen Gruppen ist wie folgt: die Wt IgG2a-Gruppe (C), Wt A-887755 (D), Tg IgG2a (E) und Tg A-887755 (F). Die durchgeführten zweiseitigen, gepaarten t-Teste ergaben einen signifikanten Abfall der finalen ^{18}F FDG-Aktivität gegenüber den Basiswerten in der Tg IgG2a-Gruppe ($p = 0,0408$) und in der Tg A-887755-Gruppe ($p = 0,0021$).

3.6.2. ^{14}C -2-Deoxy-D-Glukose

Ein histologischer Nachweis der neuronalen Stoffwechselrate wurde anhand von ^{14}C -2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) autoradiographisch durchgeführt. Den Mäusen wurde vor dem finalen PET eine Koinjektion von ^{18}F FDG und ^{14}C -2-DG verabreicht. Nach der Tomographie wurden die Gehirne histologisch aufgearbeitet. Die Auswertung erfolgte anhand von Transversalschnitten im Gesamtgehirn, im Kortex und im Hippocampus im Bereich von 1,78 mm vor bis 3,08 mm nach Bregma (Paxinos und Franklin, 2001; Abb. 39).

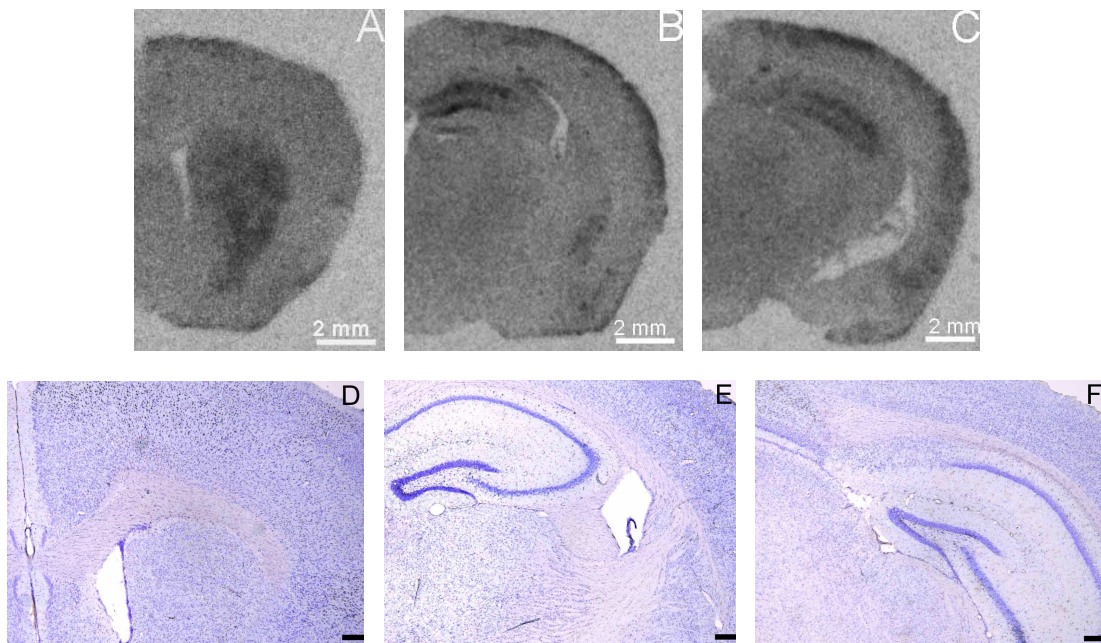


Abb. 39. Darstellung der 2-DG-Markierung bei einer 19 Monate alten Tg2576-Maus

In den Transversalschnitten sind die ausgewerteten Regionen zu erkennen, wobei **A** und **D** den rostralen Bereich, **B** und **E** den medialen Bereich und **C** und **F** den kaudalen Bereich zeigen. **A** bis **C** stellen die autoradiographische 2-DG-Markierung dar, wohingegen **D** bis **G** die Nissl-Gegenfärbung zeigen. Ausgewertet wurden das Gesamtgehirn, der Kortex und der Hippocampus. Maßstab: A/B=2 mm, D/E/F=200 µm.

Die Auswertung der autoradiographischen ^{14}C -2-DG-Markierung ergab bei den neunzehn Monate alten Tieren einen Unterschied der neuronalen Aktivität zwischen den Tg2576-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen. Die statistische Analyse der gemittelten optischen Dichten mittels Two Way ANOVA ergab im Gesamtgehirn (Abb. 40 A), im Kortex (Abb. 40 B) und im Hippocampus (Abb. 40 C) einen signifikanten Hypermetabolismus bei den transgenen Tieren gegenüber den Wildtyptieren. Im Hippocampus tritt dieser Unterschied am deutlichsten zutage, sowohl die transgene antikörperbehandelte Gruppe als auch die transgene Kontrollgruppe weisen eine gesteigerte 2-DG-Aufnahme und somit eine erhöhte neuronale Aktivität als ihre Wildtypkontrollgruppen auf ($p < 0,01$ und $p < 0,05$). Im Kortex zeigt nur die transgene Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der neuronalen Aktivität im

Vergleich zu ihrer Wildtypkontrollgruppe auf ($p < 0,05$), wohingegen zwischen den beiden antikörperbehandelten Gruppen nur ein tendenzieller Unterschied auftritt ($p < 0,1$). Aufgrund der hohen Varianzen ergab die Auswertung des Gesamtgehirnes sowohl in den antikörperbehandelten Gruppen als auch in den Kontrollgruppen nur eine Tendenz für einen transgenen Unterschied. Obwohl dieser transgene Unterschied beim neuronalen Glukosemetabolismus in allen drei ausgewerteten Gebieten gezeigt werden konnte, konnte ein Einfluss der passiven Immunisierung mittels des Antikörpers A-887755 auf die Stoffwechselrate nicht gezeigt werden.

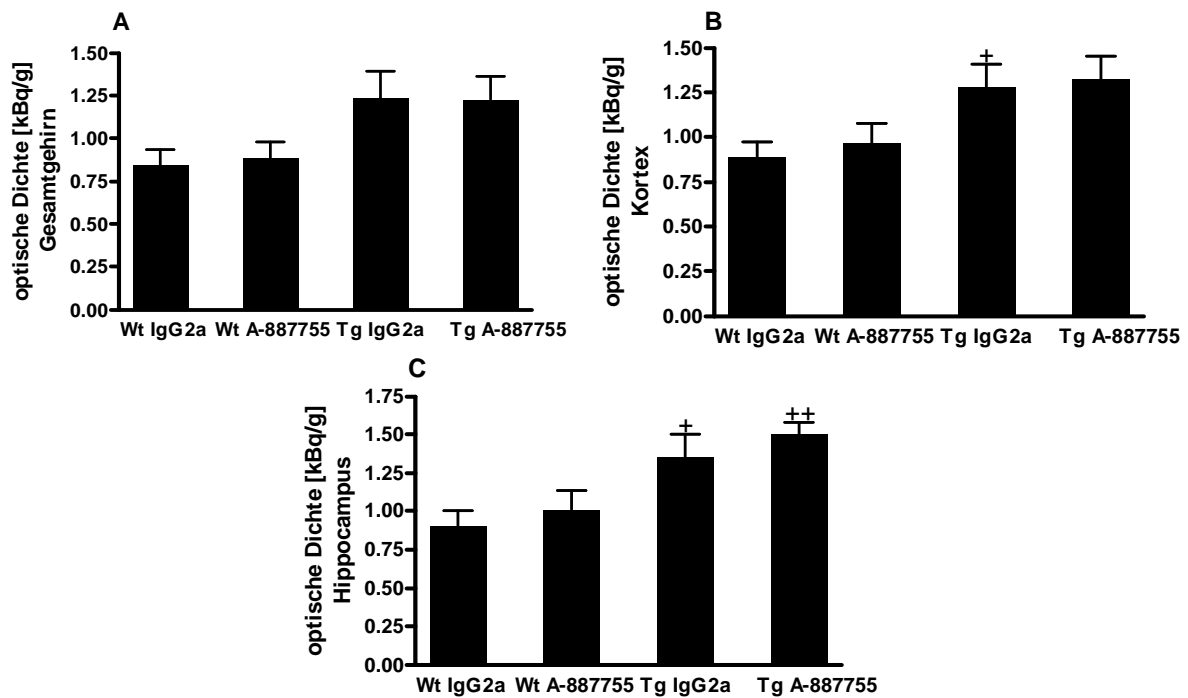


Abb. 40. Effekte der passiven Immunisierung auf die autoradiographische 2-DG-Aktivität bei Tg2576- und Wildtyp-Mäusen

A, B und C zeigen Mittelwerte und Standardfehler der gemittelten 2-DG-Aktivität bei neunzehn Monate alten Tieren ($n=8$ in Wt IgG2a; $n=11$ in Wt A-887755; $n=8$ in Tg IgG2a; $n=10$ in Tg A-887755). Dargestellt ist die mittlere optische Dichte im Gesamtgehirn (A), im Kortex (B) und im Hippocampus (C). Signifikante Unterschiede konnten mittels Two Way ANOVA im Gesamtgehirn ($p < 0,01$), im Kortex ($p < 0,01$) und im Hippocampus ($p < 0,001$) ermittelt werden. Ein nachfolgender post-hoc t-Test ergab einen signifikanten transgenen Effekt im Kortex (B) und im Hippocampus (C). B: + ($p < 0,05$) Tg IgG2a versus Wt IgG2a; C: + ($p < 0,05$) Tg IgG2a versus Wt IgG2a und ++ ($p < 0,01$) Tg A-887755 versus Wt A-887755.

3.6.3. Cytochrom-Oxidase C

Ein weiterer histologischer Nachweis der neuronalen Stoffwechselrate wurde anhand der Cytochrom-Oxidase C (COX) Aktivität durchgeführt. Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen neuronaler Aktivität und oxidativen Energiemetabolismus eignet sich COX als Marker für den neuronalen Metabolismus. Die Auswertung erfolgte in Transversalschnitten

im Neokortex und in verschiedenen Schichten des Hippocampus im Bereich von 1,70 mm bis 2,18 mm nach Bregma (Abb. 41; Paxinos und Franklin, 2001).

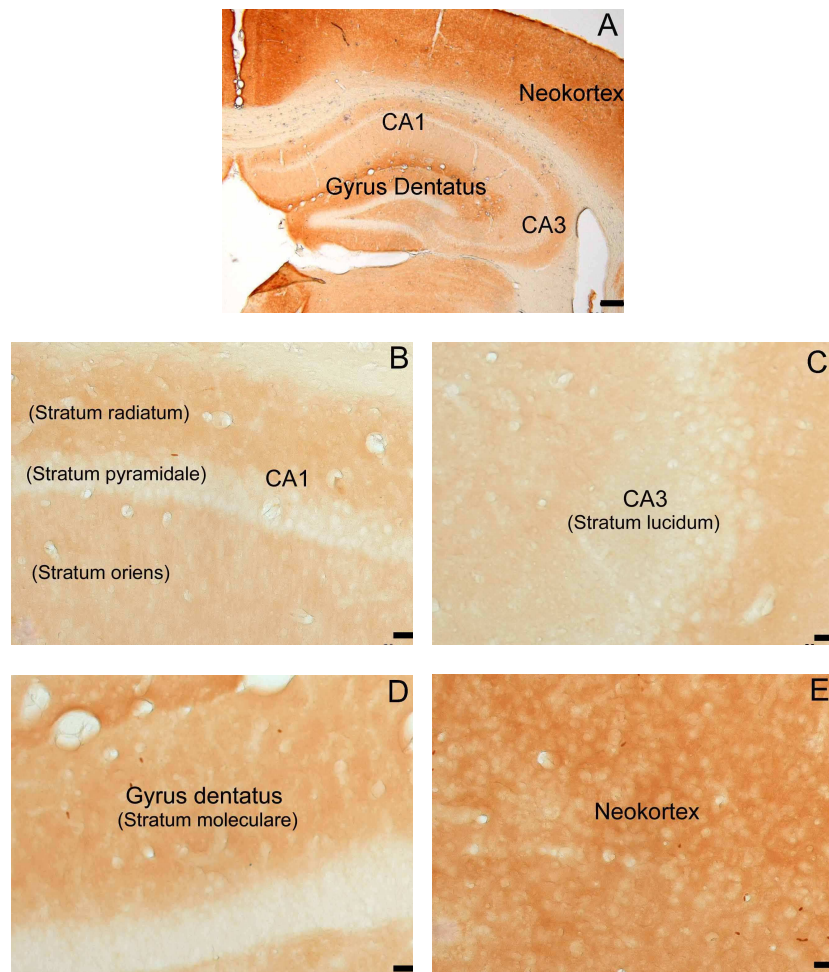


Abb. 41. Darstellung der Cytochrom-Oxidase C-Färbung bei einer 19 Monate alten Tg2576-Maus

In den Transversalschnitten sind die ausgewerteten Regionen zu erkennen, wobei **A** eine Übersicht der Areale zeigt: CA1, CA3, Gyrus Dentatus und Neokortex. **B** bis **E** zeigen die Areale und ihre einzelnen Schichten in einer Vergrößerung. In der CA1-Region wurden die Schichten Stratum radiatum, Stratum pyramidale und Stratum oriens (**B**), in der CA3-Region die Schicht Stratum lucidum (**C**) und im Gyrus Dentatus die Schicht Stratum moleculare (**D**) untersucht. Außerdem wurde der Neokortex (**E**) untersucht. Maßstab: A=200 μ m, B/C/D/E=20 μ m.

Die höchste neuronale mitochondriale COX-Aktivität bei neunzehn Monate alten Tieren tritt im Neokortex und im Gyrus Dentatus auf. Dahingegen fällt die COX-Aktivität in Stratum lucidum der CA3-Region und in Stratum pyramidale der CA1-Region deutlich geringer aus (Abb. 42 A, F). Die statistische Auswertung der gemittelten optischen Dichten ergab aufgrund der hohen Varianzen in keiner der ausgewerteten neuronalen Schichten einen signifikanten Unterschied zwischen den transgenen Tieren und den Wildtyp-Mäusen. Nur im Stratum oriens der CA1-Region konnte mittels Two Way ANOVA ein Behandlungseffekt festgestellt werden, wobei ein angeschlossener post-hoc t-Test keine signifikanten Unterschiede zeigte. Ferner konnte bei der Analyse der enzymatischen COX-Aktivität keine

Wirkung der passiven Immunisierung auf die neuronale Stoffwechselrate bei neunzehn Monate alten Tieren nachgewiesen werden.

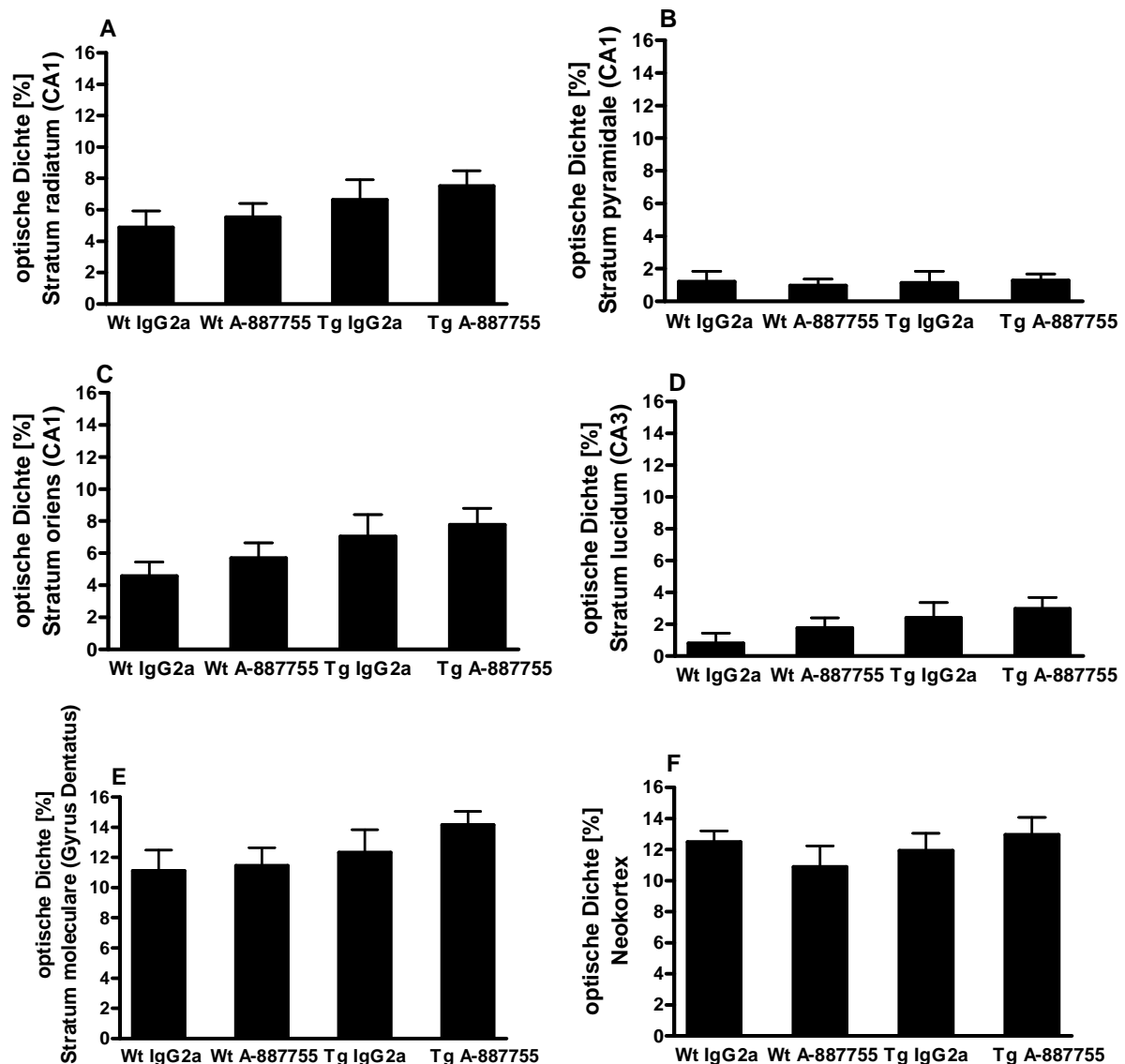


Abb. 42. Effekte der passiven Immunisierung auf die COX-Aktivität bei Tg2576- und Wildtyp-Mäusen

A - F zeigen die mittlere optische Dichte in % und Standardfehler der COX-Aktivität bei neunzehn Monate alten Tieren (n=8 in Wt IgG2a; n=11 in Wt A-887755; n=8 in Tg IgG2a; n=10 in Tg A-887755) in verschiedenen Regionen. Die Überprüfung mittels Two Way ANOVA ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,05$).

3.6.4. Vergleich der Methoden

Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob die Ergebnisse der PET-Untersuchung histologisch verifiziert werden können. Um diese Fragestellung abzuklären, wurden die Ergebnisse der PET-Untersuchung mit den Resultaten der 2-DG-Markierung verglichen.

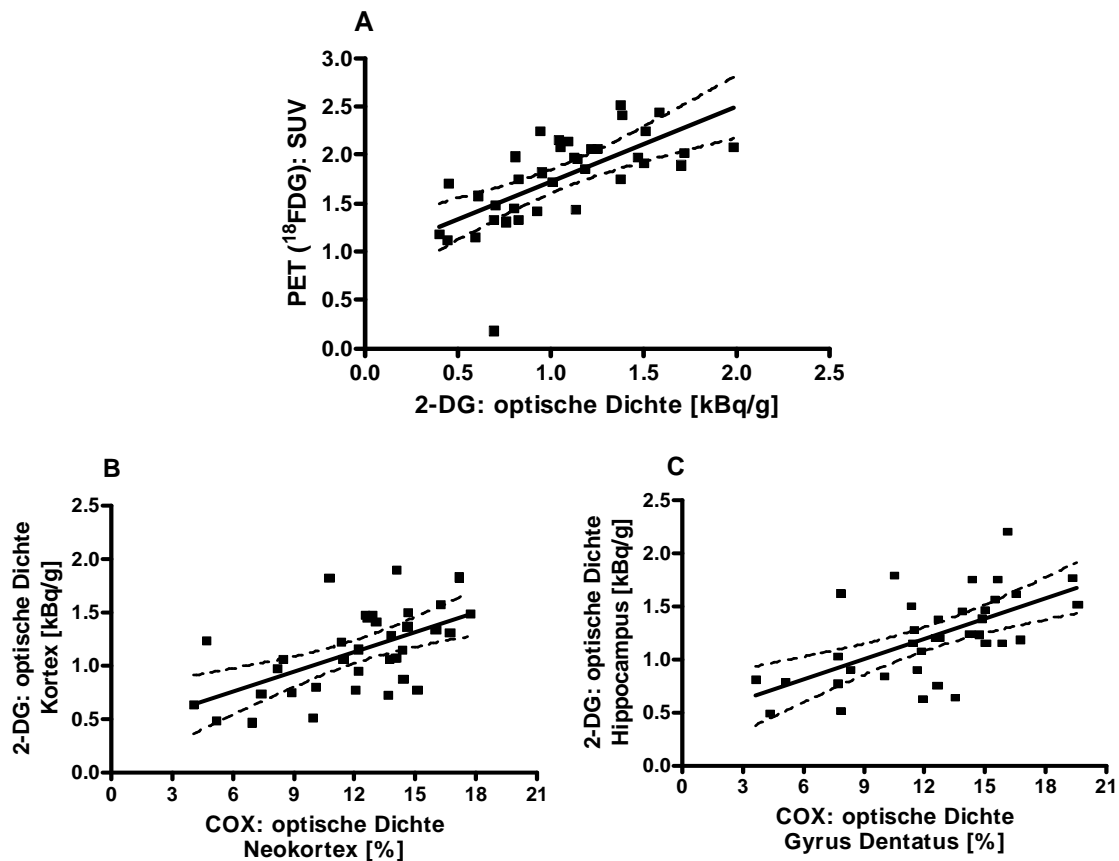


Abb. 43. Vergleich der verschiedenen Methoden hinsichtlich des Metabolismus im Gehirn

A, B und C zeigen die individuellen Werte und die linearen Regressionsgeraden des mittels ¹⁸FDG (PET), 2-DG und COX ermittelten zerebralen Glukosemetabolismus nach einer passiven Immunisierung (n=37). Die Parameter waren jeweils signifikant korreliert: A = ¹⁸FDG versus 2-DG (p<0,0001; r=0,6509); B = Kortex 2-DG versus Neokortex COX (p=0,0003; r=0,5715); C = Hippocampus 2-DG versus Gyrus Dentatus COX (p<0,0001; r=0,6066).

Der Vergleich der finalen SUV-Werte vom PET mit den gemittelten optischen Dichten der 2-DG-Markierung im Gesamtgehirn ergab einen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen den beiden Methoden (Korrelationskoeffizienten nach Pearson: r=0,6509; p<0,0001; Abb. 43 A). Daraus lässt sich schließen, dass sowohl ¹⁸FDG-PET als auch der histologische Nachweis von ¹⁴C-2-DG gut geeignet sind, um Veränderungen des neuronalen Glukosemetabolismus nachzuweisen. Aus diesem Grunde kann ¹⁸FDG-PET für präklinische Untersuchungen der neuronalen Aktivität eingesetzt werden.

Da die COX-Aktivität nur in einigen spezifischen Schichten bestimmt wurde und nicht wie beim PET im gesamten Gehirn, erfolgte keine Überprüfung des Zusammenhanges zwischen diesen beiden Methoden. Vielmehr wurde kontrolliert, ob die mit der COX-Methode ermittelten Werte repräsentativ sind im Vergleich zu den Ergebnissen, welche mittels 2-DG nachgewiesen wurden. Daher wurde ein Vergleich der beiden Methoden anhand von zwei Gehirnregionen durchgeführt: Kortex (Abb. 43 B) und Hippocampus (Abb.

43 C). Dabei wurde einmal der Neokortex (COX) mit dem Gesamtkortex (2-DG) und zum anderen der Gyrus dentatus (COX) mit dem Gesamthippocampus (2-DG) verglichen. Die statistische Auswertung zeigte, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Methoden besteht (B: $p=0,0003$; C: $p<0,0001$). Ferner ergab die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson für den Kortex $r=0,5715$ und für den Hippocampus $r=0,6066$. Die Kennzeichen der neuronalen Aktivität, Glukoseverbrauch und mitochondrialer oxidativer Energiemetabolismus, stehen also in einem direkten Zusammenhang.

4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde tierexperimentell untersucht, ob der Einsatz von Tomographieverfahren als prädiktives Modell zur Darstellung neuropathologischer Marker bei Morbus Alzheimer geeignet ist. Die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sind Verfahren, welche unterstützend zur Diagnosestellung von Morbus Alzheimer eingesetzt werden können (Cummings, 2004; Knopman et al., 2001; Silverman et al., 2001). Allerdings wurden diese Verfahren in bisherigen Forschungsarbeiten nur zur pathologischen Grundlagenforschung verwendet. Inwieweit diese Techniken für eine schnellere bzw. effektivere Diagnose bei präklinischen, tierexperimentellen Studien geeignet sind, soll anhand verschiedener Fragestellungen abgeklärt werden.

4.1. Können kleine Blutablagerungen im Gehirn von Versuchstieren nachgewiesen werden?

Mit der einleitenden Untersuchung sollte die tierexperimentelle Visualisierung von zerebralen Blutablagerungen mit dem T2- und dem T2*-gewichteten MRT-Kontrast dargestellt werden. Im Rahmen von klinischen MRTs ist die Detektion von Blutablagerungen bzw. Mikroblutungen im T2- und im T2*-gewichteten Kontrast bewiesen worden (Atlas et al., 1988; Cordonnier et al., 2007; Hanyu et al., 2003; Knudsen et al., 2001; Nakata et al., 2002; Nighoghossian et al., 2002; Viswanathan und Chabriat, 2006). Bei beiden Kontrasten beruht die Darstellung von akuten Blutungen auf Deoxyhämoglobin (Linfante et al., 1999). Im Gegensatz dazu erfolgt die Detektion von alten Blutungen aufgrund von Hämosiderinablagerungen, welche durch den Abbau von Hämoglobin gebildet werden und sich parenchymal ablagern (Viswanathan und Chabriat, 2006). Sowohl Deoxyhämoglobin als auch Hämosiderin sind paramagnetisch und daher in der Lage Magnetfeldinhomogenitäten zu erzeugen. Diese Magnetfeldinhomogenitäten wiederum führen zu schnellen Dephasierungen der Spins, wodurch eine Detektion von Blutablagerungen ermöglicht wird (Fazekas et al., 1999; Nighoghossian et al., 2002; Offenbacher et al., 1996).

Für die Beantwortung der Frage, wie sensitiv eine *in vivo* Tomographie Blutablagerungen im tierexperimentellen Einsatz ermitteln kann, wurde ein 7 T MRT-Gerät verwendet. Um die pathologischen Bedingungen einer zerebralen amyloiden Angiopathie nachzustellen, welche hauptsächlich in Arterien bzw. in Arteriolen auftritt (Kalaria, 2002; Rensink et al., 2003), wurde frisches arterielles sauerstoffreiches Blut intrazerebral in Ratten injiziert. Trotz der Tatsache, dass arterielles Blut einen höheren Anteil von Oxyhämoglobin als Deoxyhämoglobin hat, zeigte die Darstellung des arteriellen Blutes im T2*-gewichteten MRT-

Kontrast bei einer räumlichen Auflösung von $100 \times 100 \times 400 \mu\text{m}^3$ einen klar umrissenen hypointensen, in der Bilddarstellung schwarz auftretenden Signalverlust. Im Widerspruch zu klinischen MRT-Aufnahmen konnte bei dem hier durchgeführten Versuch im T2-gewichteten MRT-Kontrast bei einer räumlichen Auflösung von $100 \times 100 \times 1000 \mu\text{m}^3$ kein Signalverlust nachgewiesen werden. Aufgrund der kleinen Gehirnvolumina von Ratten erweist sich der T2*-gewichtete Kontrast als empfindlicher gegenüber dem T2-gewichteten Kontrast bei der Detektion von Blutablagerungen. Die Ursache für die höhere Sensitivität liegt in der 3D-Gradientenechosequenz beim T2*-gewichteten MRT-Kontrast begründet (Atlas et al., 1988). Die kleinen Pulswinkel der Gradientenechosequenz erlauben kürzere Repetitions- und Echozeiten (100 ms/13 ms) als beim T2-gewichteten MRT-Kontrast (3000 ms/50 ms). Da die Repetitionszeiten zusammen mit der Echozeit wesentlich die Bildaufnahmezeiten bestimmen, sind daher schnellere Bildaufnahmen möglich. Ferner gestattet eine dreidimensionale Aufnahme (3D) die Aufzeichnung von Magnetresonanzsignalen aus einem größeren Volumen, anstatt von einzelnen Schichten. Beide Faktoren bewirken eine gesteigerte Sensitivität bei der Feststellung von induzierten Magnetfeldinhomogenitäten mittels T2*-gewichteten Kontrast.

Wie erwartet konnte die empfindliche Detektion von Hämosiderinablagerungen im T2*-gewichteten Kontrast histologisch verifiziert werden. Da die beiden Resultate signifikant miteinander korrelieren, wird gezeigt, dass trotz der kleineren Gehirnvolumina von Ratten eine optimale *in vivo* Detektion von Blutablagerungen mittels T2*-gewichteten MRT-Kontrast möglich ist. Ferner wird durch den Vergleich der histologischen Ergebnisse mit den injizierten Volumina dargelegt, dass die Preußisch-Blau-Färbung eine sensitive Methode für den Hämosiderinnachweis ist.

Im Vergleich zu der histologischen Methode bietet das MRT viele Vorteile. Der herausragende Vorzug ist die Möglichkeit zur *in vivo* Untersuchung von Blutablagerungen weil im Gegensatz dazu der histologische Nachweis nur postmortal erfolgen kann. Ein weiterer Vorteil des MRTs ist die schnelle Gewinnung von Ergebnissen. Der Nachweis von Blutablagerungen mittels MRT nimmt maximal ein bis zwei Stunden in Anspruch, inklusive Vorbereitung, Tomographie und Auswertung. Dahingegen dauert eine histologische Aufarbeitung mehrere Tage. Der Zeitfaktor spielt bei präklinischen Untersuchungen eine bedeutende Rolle. Nachteilig hingegen ist das eingeschränkte räumliche Auflösungsvermögen der MRT-Aufnahmen bei kleinen Strukturen.

Basierend auf den gezeigten Resultaten ist der T2*-gewichtete MRT-Kontrast ein optimales Mittel zur *in vivo* Detektion von Blutablagerungen bei Nagetieren. Inwieweit der T2*-

gewichtete MRT-Kontrast ebenfalls eine Option zum Nachweis von Mikroblutungen im Rahmen einer präklinischen Studie sein kann, wurde im nächsten Experiment geklärt.

4.2. Können pharmakologisch induzierte Mikroblutungen nachgewiesen werden?

Eine kausale Therapiestrategie bei Morbus Alzheimer ist die passive Immunisierung. Im Rahmen von präklinischen Studien werden gegen Amyloid-beta-Peptid-Epitope (A β) gerichtete monoklonale Antikörper in Mausmodelle für Morbus Alzheimer appliziert. Das Ziel einer solchen passiven Immunisierung ist eine verminderte Neubildung von amyloiden Plaques und dadurch eine Verbesserung der kognitiven Leistungen (Bales et al., 2006; Bard et al., 2000; DeMattos et al., 2001; Dodart et al., 2002; Wilcock et al., 2004; Wilcock et al., 2006). Indes traten bei vorangegangenen präklinischen Immunisierungsstudien zerebrale Mikroblutungen als Nebenwirkung auf (Pfeifer et al., 2002; Racke et al., 2005; Wilcock et al., 2004; Wilcock et al., 2006). Als maßgeblicher Faktor für das Entstehen von Mikroblutungen wird die zerebrale amyloide Angiopathie bei Morbus Alzheimer-Patienten diskutiert. Diese tritt sehr häufig aufgrund von Strukturveränderungen in kortikalen und leptomeningealen Arterien oder Arteriolen auf und wird durch amyloide Ablagerungen in diesen Gefäßen charakterisiert (Jellinger, 2002; Kalaria, 2002; Rensink et al., 2003; Stopa et al., 2008). Die Einlagerung von vaskulärem A β , zum größten Teil A β ₁₋₄₀, führt zu einem Verlust der Muskelgeschmeidigkeit der Gefäßwände und dadurch zu einer Schwächung der Gefäßwände (Auerbach et al., 2003; Rensick et al., 2003; VanDorpe et al., 2000). Die klinische Relevanz der präklinisch aufgetretenen Mikroblutungen ist unklar. Bekannt ist lediglich, dass bei Morbus Alzheimer-Patienten generell Mikroblutungen vermehrt auftreten (Hanyu et al., 2003; Jellinger, 2002; Nakata et al., 2002). Im Gegensatz zu präklinischen Studien konnte bei den klinischen passiven Immunisierungen bis jetzt nur bei einem Patienten von einer gestiegenen Anzahl von Mikroblutungen berichtet werden (Grundman und Black, 2008).

Ein Ziel bei der Entwicklung neuer Antikörper ist daher nicht nur eine Verbesserung der kognitiven Defizite, sondern Nebenwirkungen wie Mikroblutungen zu vermeiden. Deswegen wurden zwei neue monoklonale anti-A β Antikörper der Firma Abbott Biocenter in einer präklinischen Studie auf ihr Sicherheitsprofil in Bezug auf die Entstehung von Mikroblutungen überprüft. Da im Rahmen dieser Arbeit der Einsatz von Tomographien bei präklinischen Studien untersucht werden sollte, erfolgte der Nachweis der Mikroblutungen sowohl mittels MRT als auch histologisch. Die Mikroblutungen im Kortex und im Hippocampus sind im T2*-gewichteten MRT-Kontrast, wie in der Literatur beschrieben

(Fazekas et al., 1999; Viswanathan und Chabriat, 2006), als kleine hypointense Signalverluste darstellbar.

Aufgrund der Ergebnisse von DeMattos et al. (2004) und Racke et al. (2004), wurde bei dem anti-A β Antikörper 8F5, der vor allem Oligomere und nicht so sehr die in Gefäßablagerungen vorkommende Form von A β erkennt, eine geringere Entwicklung von Mikroblutungen als bei dem unspezifischeren anti-A β Antikörper 6G1 erwartet. Diese Annahme wurde im Rahmen des Experimentes nur bedingt bestätigt. Mittels des T2*-gewichteten MRT-Kontrastes konnte innerhalb der beiden antikörperbehandelten Versuchsgruppen ein signifikanter Anstieg der Mikroblutungen festgestellt werden. Hierbei war der Zuwachs innerhalb der 8F5-Gruppe geringfügig höher als in der 6G1-Gruppe. Innerhalb der mit PBS behandelten Kontrollgruppe konnte hingegen keine Zunahme der Mikroblutungen nachgewiesen werden. Des Weiteren wiesen beide antikörperbehandelten Gruppen einen signifikanten Anstieg der Mikroblutungen gegenüber der Kontrollgruppe auf. Verifiziert wurden die Tomographieergebnisse durch die histologischen Resultate. Auch hier wurde eine signifikante Zunahme der Mikroblutungen deutlich. Im Widerspruch zu bekannter Literatur (DeMattos et al., 2004; Racke et al., 2004; Racke et al., 2005) weisen die hier aufgezeigten Ergebnisse darauf hin, dass die Bindung der Antikörper an monomeres oder fibrilläres A β bei der Entwicklung von Mikroblutungen nicht allein ausschlaggebend ist. Ferner konnte konform zur Literatur (Pfeifer et al., 2002; Wilcock et al., 2006) eine Assoziation der Mikroblutungen mit Gefäßen und daher mit der zerebralen amyloiden Angiopathie beobachtet werden.

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der zerebralen amyloiden Angiopathie und somit von Mikroblutungen nach einer Immunisierung spielt das Alter der Versuchstiere. Werden junge und alte Tiere mit einer humanen Mutation des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) immunisiert, kann eine Entwicklung von Mikroblutungen nur bei den alten Tieren beobachtet werden (Wilcock et al., 2004). Gefördert wird das Auftreten von zerebralen amyloiden Angiopathien durch altersabhängige Strukturveränderungen der Arterien. Diese strukturellen vaskulären Abnormalitäten können durch eine Verdickung der Intima, Atherosklerose, degenerierte endotheliale Muskelgefäßwände oder Hypertonie hervorgerufen werden (Rensink et al., 2003; VanDorpe et al., 2000). Bei der passiven Immunisierung binden anti-A β Antikörper an vaskuläres Amyloid, wodurch die labilen Gefäßwände weiter geschädigt werden (Pfeifer et al., 2002). Die Ursache hierfür ist vermutlich ein anti-A β antikörpervermittelter Abbau der vaskulären amyloiden Plaques (Racke et al., 2005; Wilcock et al., 2007).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die MRT-Methodik zur Detektion von Mikroblutungen ein adäquater Ersatz der Histologie sein kann. Obwohl die Anzahl der jeweils ermittelten Mikroblutungen miteinander korrelieren, konnten histologisch mehr Mikroblutungen festgestellt werden als im MRT. Bei einem direkten Vergleich der MRT-Aufnahmen mit den histologischen Schnitten konnte gezeigt werden, dass Hämosiderinablagerungen ab einer Größe von 60 μm im T2*-gewichteten MRT-Kontrast gleich lokalisiert sind. Hämosiderinablagerungen mit einer geringeren Größe als 60 μm konnten aufgrund der räumlichen Auflösung des MRTs (100 x 100 x 400 μm^3) nicht nachgewiesen werden. Die Ursache für den MRT-Nachweis von Mikroblutungen ab 60 μm Größe, trotz der Auflösung in einer Ebene von 100 x 100 μm^2 , beruht auf dem „blooming“ Effekt. Der T2*-gewichtete „blooming“ Effekt beruht auf der Gradientenechosequenz und bezeichnet Signalausfälle an der Grenze von Mikroblutungen und umgebenden Gewebe, weshalb Mikroblutungen größer erscheinen als sie in Wirklichkeit sind (Ripoll et al., 2004; Viswanathan und Chabriat, 2006).

Eine Limitierung beim MRT in Bezug auf die Detektion von Mikroblutungen besteht durch das begrenzte Auflösungsvermögen bei den kleinen Gehirnstrukturen von Mäusen. Wird das räumliche Auflösungsvermögen auf 100 x 100 x 200 μm^3 verringert, können auch kleinere Mikroblutungen detektiert werden. Das dadurch verschlechterte Signal-Rausch-Verhältnis muss durch eine Verdopplung der MRT-Aufnahmen kompensiert werden. Dies wiederum führt zu einer Verdopplung der Tomographiezeit und stellt damit eine höhere Belastung für die Tiere dar. Aufgrund der hohen Belastung wurde die räumliche Auflösung von 100 x 100 x 400 μm^3 als optimal bei *in vivo* Aufnahmen betrachtet.

Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Anzahl ermittelter Mikroblutungen könnte auch die nicht-identische Schnittstärke sein, denn in MRT-Aufnahmen betrug sie 400 μm und in den histologischen Schnitten 30 μm . Ferner wurde jeder achte Schnitt für die histologische Auswertung verwendet. Daraus resultieren leichte Verschiebungen beim Vergleich von MRT-Aufnahmen mit den histologischen Schnitten.

Zwei wesentliche Vorteile des MRT konnten in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden, die *in vivo* Detektion des untersuchten Parameters und die kurze Analysezeit. Ferner ermöglichten die *in vivo* Tomographien die Unterscheidung von Mikroblutungen, welche vor oder nach der Behandlung aufgetreten sind. Daher konnten mit dieser Methode die effektiv neu entstandenen Mikroblutungen ermittelt werden. Dahingegen konnten in der postmortalen Analyse nur die gesamten Mikroblutungen nachgewiesen werden, unabhängig davon ob sie schon vor oder erst nach der Applikation auftraten. Das MRT ermöglicht

demzufolge einen sensitiven *in vivo* Nachweis von Mikroblutungen, welche durch eine passive Immunisierung induziert wurden und ist daher für eine longitudinale Kontrolle der Mikroblutungen geeignet.

4.3. Kann der zeitliche Verlauf von pharmakologisch induzierten Mikroblutungen nachgewiesen werden?

Neben der Abklärung der Frage ob vor dem Beginn einer präklinischen passiven Immunisierungsstudie schon Mikroblutungen vorhanden waren, war auch die Fragestellung von Interesse wann bzw. wie schnell nach Behandlungsbeginn sich diese Mikroblutungen entwickeln. Mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten longitudinalen Studie konnte diese Fragestellung nicht zufriedenstellend beantwortet werden. Entgegen den Erwartungen entwickelten sich trotz des hohen Applikationsmodus (dreimal pro Woche) des monoklonalen anti-A β Antikörpers 6G1, keine mittels T2*-gewichteter MRT-Kontrast detektierbaren Mikroblutungen. Dies kann mehrere Gründe haben. Eine Ursache könnte das Tieralter zu Beginn der Immunisierung sein. Zu diesem Zeitpunkt waren die Mäuse dreizehn bis fünfzehn Monate alt, d.h. ca. vier Monate jünger als die Versuchstiere in der vorangegangenen Studie. Die hier eingesetzten Versuchstiere wiesen zudem Überexpression einer anderen humanen Mutation von APP, der sogenannten London-Mutation (APP/Lo), auf. Sie beginnen mit der Entwicklung von amyloiden Plaques im Alter von zwölf Monaten (Moechars et al., 1999). Ferner konnte bei diesen Mäusen ab einem Alter von fünfzehn Monaten vaskuläres A β und somit zerebrale amyloide Angiopathien nachgewiesen werden (VanDorpe et al., 2000). Daher wurde ein Tieralter von dreizehn bis fünfzehn Monaten ausgewählt. Die in der vorigen Studie eingesetzten Tg2576-Mäuse exprimieren die sogenannte schwedische APP-Mutation und entwickeln deutlich früher amyloide Plaques, nämlich ab dem Alter von acht Monaten (Callahan et al., 2001). Möglicherweise weisen daher die Tg2576-Mäuse mehr und eher zerebrale amyloide Angiopathien auf. Unter Umständen liegt bei den dreizehn bis fünfzehn Monate alten APP/Lo-Mäusen eine geringere A β -bedingte Gefäßwandschädigung vor, so dass eine passive Immunisierung in diesem Alter nicht zur Entwicklung von Mikroblutungen führte. Klarheit kann nur eine vergleichende longitudinale Studie der Tg2576 und APP/Lo Mäusestämme bringen. Unterstützt wird die These durch die Studie von VanDorpe et al. (2000), in der bei keiner unbehandelten APP/Lo-Maus (bis 24 Monate alt) eine Mikroblutung festgestellt werden konnte. Da der zur Immunisierung eingesetzte Antikörper in der ersten und in dieser Studie aus derselben Präparation stammt, kann eine Unwirksamkeit des Antikörpers ausgeschlossen werden.

Am Ende des Versuchs konnte bei zwei APP/Lo-Mäusen (22-24 Monate alt) in MRT-Aufnahmen je eine Mikroblutung nachgewiesen werden. Postmortal wurden histologisch nur geringfügig mehr Mikroblutungen nachgewiesen. Angesichts der schwachen Konstitution der Tiere wurde die Behandlung nach dreimonatiger Applikation abgebrochen, was ebenfalls ein Grund für die Reduzierung von Mikroblutungen in diesem Versuch darstellen könnte. Basierend auf den Resultaten dieser Arbeit scheint eine Kombination von mehreren Faktoren für die Entwicklung von Mikroblutungen bei einer Immunisierung ausschlaggebend zu sein: zum einen spielt die alters- und tierstammabhängige Entwicklung von zerebralen amyloiden Angiopathien bei transgenen Tieren eine entscheidende Rolle für das Auftreten spontaner Mikroblutungen. Erst dann können Mikroblutungen, z.B. durch eine Immunisierung, zusätzlich induziert werden.

Dass ein tierexperimenteller Einsatz eines MRTs zur Überwachung der Entstehung von Mikroblutungen nach einer passiven Immunisierung geeignet ist, zeigt eine ergänzende Untersuchung von Tg2576-Mäusen mit dem anti-A β Antikörper 8F5 (unveröffentlichte Daten). In dieser Studie wurde eine stetige Zunahme von Mikroblutungen bei siebzehn Monate alten Tieren während einer achtzehnwöchigen Behandlung beobachtet. Die hier gezeigten Resultate bestätigen die Erkenntnisse aus Versuch 4.2, wonach die *in vivo* Tomographie mittels T2*-gewichteter MRT-Kontrast eine optimale Möglichkeit ist um Mikroblutungen nachzuweisen. Die dabei gewählten MRT-Parameter sind optimal um eine empfindliche Nachweismethode darzustellen. Weiterhin wird durch dieses Experiment gezeigt, dass longitudinale *in vivo* Tomographiestudien hervorragend für die Kontrolle zur Entstehung von Mikroblutungen während einer Immunisierung geeignet sind. Für zukünftige präklinische Untersuchungen bedeutet dies, dass erheblich früher Aussagen über das Auftreten der Nebenwirkung „Mikroblutung“ getroffen werden können und nicht erst am Ende einer Langzeitbehandlung von einigen Monaten. Dieses bedeutet einen enormen Zeitgewinn und kann notwendige Entscheidungen in Bezug auf die weitere Entwicklung einer Studie bzw. eines Projektes unterstützen.

4.4. Können amyloide Plaques nachgewiesen werden?

Amyloide Plaques gelten als eines der Hauptmerkmale in der Pathogenese von Morbus Alzheimer. Bei der Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien könnte daher die Bekämpfung dieser amyloiden Plaques eine wichtige Rolle spielen, z.B. durch eine passive Immunisierung mit spezifischen anti-A β Antikörpern. Durch eine Langzeitbehandlung mit diesen Antikörpern wird eine Reduzierung bzw. eine verminderte Neubildung des löslichen und des fibrillären A β erwartet (Bard et al., 2000; DeMattos et al., 2001; Wilcock et al., 2004). Eine

direkte Visualisierung der amyloiden Plaques könnte sowohl zur Kontrolle der Plaquebildung als auch zum Überwachen der Wirksamkeit einer therapeutischen Maßnahme verwendet werden. Deshalb wäre im Rahmen einer präklinischen Immunisierungsstudie ein direkter *in vivo* Plaquenachweis durch Tomographieverfahren von herausragendem Interesse. Eine Möglichkeit zum Nachweis von amyloiden Plaques könnte der T2*-gewichtete MRT-Kontrast darstellen.

Die Literatur hinsichtlich des Plaquenachweises mittels MRT ist widersprüchlich. Einerseits berichten einige Studien über die Möglichkeit des Plaquenachweises bei transgenen Mäusen ohne den Einsatz von Kontrastmittel, basierend auf dem Eisengehalt von amyloiden Plaques (Benveniste et al., 1999; Jack et al., 2004; Jack et al., 2005; Vanhoutte et al., 2005; Zhang et al., 2004). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Preußisch-Blau-Färbung zur Darstellung des Eisengehaltes in den Plaques war hingegen negativ. Obwohl durch eine Modifikation dieser Methode eventuell die Sensitivität erhöht werden kann (Dhenain et al., 2009; Jack et al., 2005), war die in dieser Arbeit verwendete histologische Färbung empfindlich genug um Eisenkonzentrationen anzuzeigen, die im T2*-gewichteten Kontrast nicht detektiert werden konnten (siehe Nachweis von Mikroblutungen in Kapitel 4.2). Andere Studien konnten zeigen, dass nur sehr große amyloide Plaques mittels MRT detektiert werden können, dass aber für die Mehrheit der Plaques ein zusätzliches Kontrastmittel benötigt wird (Dhenain et al., 2002; Higuchi et al., 2005; Poduslo et al., 2002; Wadghiri et al., 2003; Wadghiri et al., 2005).

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen konnten anhand von *ex vivo* MRT-Aufnahmen keine amyloiden Plaques mittels T2*-gewichtetem Kontrast ohne Kontrastmittel nachgewiesen werden. Die Steigerung des räumlichen Auflösungsvermögens im T2*-gewichteten MRT-Kontrast auf $100 \times 100 \times 200 \mu\text{m}^3$ bzw. auf $100 \times 100 \times 150 \mu\text{m}^3$ war für den Nachweis von amyloiden Plaques nicht ausreichend. Allerdings konnten dadurch mehr Mikroblutungen dargestellt werden als bei einer größeren Schnittdicke von $400 \mu\text{m}$ (siehe Nachweis von Mikroblutungen in Kapitel 4.2). Für eine weitere Erhöhung des räumlichen Auflösungsvermögens, z.B. auf $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ oder mehr, hätten die Schnittdicke und das Messfeld weiter verringert werden müssen. Dies hätte zu einer Verstärkung von Artefakten (Blutgefäße, hämorrhagische Transformationen oder Eisenablagerungen) bzw. zur Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses geführt. Um diese Effekte zu kompensieren müsste die Tomographiezeit deutlich verlängert werden. Dies ist jedoch für *in vivo* MRTs nicht möglich, da hierbei eine Limitierung der Tomographiezeit durch geltende Tierschutzvorschriften besteht. Eine Tomographiezeit von mehr als 1,5 Stunden stellt eine starke Belastung für die Gesundheit von Mäusen dar. Ferner nimmt die Wirkung der

Medetomidin/Ketamin-Anästhesie ab, wodurch sich das Risiko für leichte Kopfbewegungen erhöht, was wiederum die Qualität der MRT-Aufnahmen negativ beeinflusst. Eine Änderung der Anästhesie, z.B. Isoflurangabe während des MRTs, kam aufgrund der Tierschutzvorschriften nicht in Frage.

Um die magnetische Resonanz zu erhöhen wurde daher das Kongorot-Analogon FSB [(E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)stryrylbenzen] als Kontrastmittel verwendet. Entsprechend den Resultaten von Sato et al. (2004), beweisen die hier gezeigten histologischen Ergebnisse, dass FSB eine sehr gute Bindungsfähigkeit an amyloide Plaques besitzt. Dagegen konnte FSB im ^{19}F -Kanal des MRTs nur in sehr hohen Konzentrationen (1 M) detektiert werden. Obwohl das hier beschriebene Vorgehen (räumliche Auflösung, Repetitions- und Echozeit u.a.) hinsichtlich des Plaquenachweises an das Prozedere von Higuchi et al. (2005) angelehnt war, konnte kein MRT-Signal detektiert werden. Das verwendete 7 T MRT-Gerät ist höchstwahrscheinlich nicht sensitiv genug um die Magnetresonanz von ^{19}F in einer *in vivo* verträglichen Dosis nachzuweisen.

Ein anderes in dieser Arbeit nicht verwendetes Kontrastmittel ist ein Gadolinium-Chelatkomplex. Durch die Verbindung eines solchen Gadoliniumkomplexes an eine Komponente mit einer hohen Bindungsaffinität an A β kann laut Literatur ein MRT-Nachweis erfolgen (Poduslo et al., 2002; Wadghiri et al., 2003; Wadghiri et al., 2005). Allerdings wurden in der Literatur keine qualitativ ausreichenden *in vivo* MRT-Aufnahmen bei Mäusen dargestellt. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Versuche mit dem Kontrastmittel Gadolinium durchgeführt.

Ursache für die schlechte Detektion von amyloiden Plaques ist vermutlich die begrenzte räumliche Auflösung bei tierexperimentellen Tomographien mit den derzeit gebräuchlichen MRT-Geräten. Diese räumliche Auflösung kann aus den zuvor beschriebenen Gründen bei *in vivo* Tomographien nicht erhöht werden. Daher kann gegenwärtig kein *in vivo* Nachweis zur Beobachtung der Entwicklung von amyloiden Plaques im Laufe der Alterung bzw. im Rahmen einer Pharmakotherapie mittels MRT durchgeführt werden. Die stetige Weiterentwicklung der MRT-Technik in Bezug auf Leistungsstärke, Spulen oder Kontrastmittel mit einer stärkeren Magnetresonanz ermöglicht höchstwahrscheinlich in einigen Jahren einen *in vivo* Plaquenachweis mittels MRT.

Eine Alternative für den *in vivo* Plaquenachweis mittels MRT könnte die PET-Untersuchung sein. Durch die Verwendung eines Radioliganden können hiermit amyloide Plaques detektiert werden. Ein solcher Radioligand mit einer hohen Affinität für A β ist ^{11}C -PIB

(Pittsburgh Compound-B; Ikonovic et al., 2008; Klunk et al., 2004; Maeda et al., 2007; Mathis et al., 2002). Allerdings besitzt ^{11}C nur eine kurze Halbwertszeit von 20,3 Minuten, weshalb ein Zyklotron in direkter Nähe zum PET-Gerät notwendig ist. Im Rahmen dieser Arbeit stand dieses nicht zur Verfügung. Da andere Radioliganden im Vergleich mit ^{11}C -PIB eine ungenügende Bindungsaffinität gegenüber A β besitzen, wurde kein amyloider Plaques-nachweis mittels PET durchgeführt.

4.5. Kann ein pharmakologischer Einfluss auf die Plaquesdichte histologisch verifiziert werden?

Da ein *in vivo* Plaquesnachweis im Rahmen dieser Studie mittels MRT oder PET nicht möglich war, wurde ein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten und analogen Bindungssequenzen der hier verwendeten anti-A β Antikörper (6G1 und 8F5) mit bekannten klinisch und präklinisch verwendeten Antikörpern anderer Firmen (3D6 von Elan/Wyeth und m266 von Lilly), wurde demgemäß eine Abnahme der amyloiden Plaquesdichte erwartet (Bard et al., 2000; Legleiter et al., 2004; Pfeifer et al., 2002). Entgegen den Annahmen konnte aber keine Reduktion der Plaquesdichte durch eine chronische Applikation der beiden anti-A β Antikörper erzielt werden. Der monoklonale 6G1 Antikörper erkennt ein N-terminales A β -Epitop und bindet sowohl an amyloide Plaques als auch an sAPP α (lösliches Amyloid-Precursor-Protein α), während der spezifische 8F5 Antikörper ein zentrales A β -Epitop erkennt und bevorzugt an lösliches A β und weniger an amyloide Plaques bindet (Barghorn et al., 2005). Obwohl in der Literatur von der unterschiedlichen Effektivität von N-terminalen und zentralen Sequenzen bindenden Antikörpern in Bezug auf die Plaquesdichte berichtet wurde (Seubert et al., 2008), konnte dies hier trotz der unterschiedlichen Bindungsprofile der Antikörper nicht gezeigt werden. Eine Erklärung für diesen Unterschied ist die Verwendung von zwar strukturell ähnlichen, aber nicht identischen Antikörpern in diesen Studien (Bard et al., 2000; Legleiter et al., 2004; Pfeifer et al., 2002; Seubert et al., 2008).

Ungeachtet der Tatsache, dass durch die Applikation der 6G1- und 8F5-Antikörper bei der hier durchgeführten Untersuchung keine Verminderung der Plaquesdichte erreicht werden konnte, zeigten behandelte Tg2576-Mäuse in Verhaltensexperimenten (Objekt-Erkennungsaufgaben) verbesserte kognitive Leistungen als Kontrolltiere (Ebert et al., 2008). Diese Resultate sind mit früheren Studien in Übereinstimmung (Dodart et al., 2002; Kotilinek et al., 2002), in denen eine passive Immunisierung ebenfalls zu verbesserten kognitiven Leistungen ohne eine Reduzierung der Plaquesdichte führte. Ferner wurde bei humanen Studien keine Korrelation von amyloiden Plaques mit dem Demenzstadium nachgewiesen (Katzman

et al., 1988; Näslund et al., 2000). Es stellt sich daher die Frage inwieweit das Auftreten von amyloiden Plaques mit Verhaltensauffälligkeiten in Zusammenhang gebracht werden kann. Vermutlich spielt bei der Entwicklung von Morbus Alzheimer eine Vielzahl von Pathomechanismen eine Rolle. So wurde die früher favorisierte Hypothese der amyloiden Kaskade, welche besagt dass eine gesteigerte $A\beta_{1-42}$ -Produktion eine vermehrte Ablagerung von amyloiden Plaques und dadurch wiederum kognitive Defizite zur Folge hat (Hardy und Higgins, 1992), durch die Autoren selbst relativiert. $A\beta$ hat zwar einen großen Einfluss auf die Pathogenese von Morbus Alzheimer, aber Presenilin- und Tau-Mutationen können sowohl die $A\beta$ -Entwicklung beeinflussen als auch selbst zu kognitiven Defiziten führen (Hardy und Selkoe, 2002; Hardy, 2006).

4.6. Können die hypointensen Signale im Thalamus durch ergänzende histologische Marker abgeklärt werden?

Im Gegensatz zu den durch Mikroblutungen im Kortex und im Hippocampus entstehenden Signalverlusten, traten unerwartet bei einigen Tieren abnormale Signalverluste auf. Postmortal sollte die Ursache dieser hypointensen Signale abgeklärt werden. Grundsätzlich können die aufgetretenen subkortikalen hypointensen MRT-Signale nach ihrer Lokalisation (meistens im Thalamus und selten in anderen Regionen) und nach ihrer Morphologie klar von den Mikroblutungen abgegrenzt werden.

Ein großes subkortikales, nicht-thalamisches hypointenses Signal wurde mittels Preußisch-Blau-Färbung als Aneurysma identifiziert. Aneurysmen beruhen wahrscheinlich auf arteriosklerotischen Gefäßwandschädigungen, welche in Tiermodellen mit einer Überexpression von APP auftreten (Rensink et al., 2003; VanDorpe et al., 2000). Das Aneurysma konnte aufgrund seiner Größe nicht nur im T2*-gewichteten sondern auch im T2-gewichteten Kontrast nachgewiesen werden. Der Gefäßdurchmesser eines Aneurysmas ist wesentlich größer als von ungeschädigten Blutgefäßen, wodurch vermehrt die paramagnetische Substanz Deoxyhämoglobin vorhanden ist. Die dadurch erzeugte Dephasierung der Protonen ist für eine Darstellung mittels des T2-gewichteten Kontrastes ausreichend.

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgetretenen bilateralen thalamischen hypointensen T2*-gewichteten MRT-Signale konnten durch eine Von Kossa-Färbung als Kalzifizierungen bestätigt werden. In Übereinstimmung mit der Literatur wurden die kristallinen Kalziumverbindungen im Nucleus ventralis posterolateralis und Nucleus ventralis posteromedialis lokalisiert (Fraser, 1968; Dhenain et al., 2009; Kalueff et al., 2006). Diese Kalzifizierungen sind allerdings nicht nur auf transgene Tiere mit einer Überexpression von APP (Tg2576

und APP/Lo) beschränkt. Derartige Ablagerungen konnten ebenso bei transgenen Mäusen mit einer Mutation im Presenilin 1-Gen (PS1) oder bei doppeltransgenen Tieren mit Mutationen in APP- und Presenilin 1-Genen (APP/PS1; Delatour et al., 2006; Dhenain et al., 2009; Jack et al., 2004), bei Vitamin D-Rezeptor-Knockoutmäusen (Kalueff et al., 2006) sowie bei diversen nicht-transgenen Mäusestämmen (Fraser, 1968) nachgewiesen werden. Ferner konnten Kalzifizierungen in diversen humanen Erkrankungen diagnostiziert werden, u.a. bei Morbus Alzheimer, Parkinson und Down Syndrom (Friedland et al., 1990; Mann, 1988; Narita et al., 2002; Ramonet et al., 2006; Vermersch et al., 1992).

Gemeinsam ist allen tierexperimentellen Resultaten, dass die Kalzifizierungen in alternden Mäusen auftreten. Es können jedoch Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit dieser Kalzifizierungen beobachtet werden. Trotz des zum Teil sehr hohen Tialters konnte Fraser (1968) nur 34 Kalzifizierungen bei 2000 analysierten Gehirnen feststellen. Bei Dhenain et al. (2009) wiesen die APP/PS1-Mäuse prozentual deutlich mehr Kalzifizierungen als die PS1-Mäuse auf. Die Hypothese, dass diese thalamischen Ablagerungen amyloide Plaques enthalten (Dhenain et al., 2009; Jack et al., 2004; Vanhoutte et al., 2005), kann nicht bestätigt werden, da Wildtyp-Mäuse (z.B. 30 Monate alt) ebenfalls einen positiven Nachweis im MRT für Kalzifizierungen, aber nicht für amyloide Plaques aufzeigten. Obwohl das Vorhandensein von amyloiden Plaques keine Voraussetzung für die Entwicklung der Kalzifizierungen ist, scheint aber eine Überexpression von APP die Häufigkeit dieser Ablagerungen zu steigern und das Auftretsalter herabzusetzen. Ferner nimmt bei Mäusen mit einer APP-Mutation die Anzahl der auftretenden Kalzifizierungen mit steigendem Alter zu. Die passive Immunisierung mit gegen A β gerichteten Antikörpern hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung von Kalzifizierungen.

Die Kalzifizierungen sind höchstwahrscheinlich auf eine veränderte Kalziumhomöostase im Alter zurückzuführen. Mit zunehmendem Alter treten Modifikationen von Stoffwechselprozessen auf, wodurch der Transport von Kalzium über die Zellmembranen gestört wird (Peterson et al., 1989). Solche Prozesse können der Energiemetabolismus, die Kontrolle von freien Radikalen, Nekrosen, Apoptosen u.a. sein (Kim, 1995; Mahy et al., 1999; Mattson, 1994). Diese Veränderungen führen zu einem Anstieg der freien Kalziumionen, welche dann präzipitieren und Cluster bilden (Mahy et al., 1999). Über das verstärkte und frühere Auftreten der bilateralen Kalzifizierungen im Nucleus ventralis posterior bei Mäusen mit einer Mutation von APP kann nur spekuliert werden. Möglicherweise beeinflusst ein veränderter A β -Metabolismus die Kalziumhomöostase im thalamischen Bereich besonders stark. Unterstützt durch die im Alter und bei Morbus Alzheimer verstärkt auftretenden Gefäßwandschädigungen, könnte im thalamischen Bereich eine vermehrte Clusterbildung

von Kalziumionen stattfinden. Grund für diese Annahme ist eine bei einigen Tieren beobachtete Assoziation von Kalzifizierungen mit umgebenden Gefäßen. Diese Beobachtung ist konform mit bekannter Literatur (Fraser, 1968; Kalueff et al., 2006).

Hinsichtlich der Ursache für die Detektion dieser Kalzifizierungen mittels T2*-gewichteten MRT existieren widersprüchliche Meinungen. Einerseits wurde der Eisengehalt von amyloiden Plaques als verantwortlich für die Detektion der Kalzifizierungen gemacht (Jack et al., 2004; Vanhoutte et al., 2005), andererseits eisen- und mineralhaltige Strukturen mit einer Kolo-kalisation von amyloiden Plaques (Delatour et al., 2006; Dhenain et al., 2009). Im Gegensatz dazu konnte bei den hier durchgeführten Experimenten bei keinem Tier (transgen und Wildtyp) weder lösliches oder fibrilläres A β noch Eisen im thalamischen Bereich nachgewiesen werden. Fraser (1968) konnte ebenfalls kein Eisen im Thalamus feststellen. Daraus resultiert, dass der Nachweis der Kalzifizierungen im T2*-gewichteten Kontrast nicht auf den durch Eisen induzierten Magnetfeldinhomogenitäten beruhen kann. Eine passendere Erklärung ist, dass die kristallinen Kalziumablagerungen im Gegensatz zum übrigen Gewebe sehr wenige Wasserstoffkerne (= Spins) enthalten. Da normalerweise diese Wasserstoffkerne den Hauptteil der Magnetresonanz induzieren, kann im Bereich der Kalzifizierungen wenig Magnetresonanz erzeugt werden. Dies wiederum führt zu einer verringerten Magnetresonanzsignalintensität, wodurch die Ablagerungen dunkel als Signalverluste erscheinen.

Ein weiterer Vorzug des MRTs ist also neben der *in vivo* Kontrolle von Mikroblutungen das Überwachen von sich altersabhängig entwickelnden Kalzifizierungen sowie der Bildung von Aneurysmen während einer präklinischen Studie.

4.7. Kann eine pharmakologische Beeinflussung des Metabolismus nachgewiesen werden?

Die regionale Störung des zerebralen Metabolismus ist ein bedeutsames Kennzeichen bei Morbus Alzheimer-Patienten. Dabei wird der zerebrale Stoffwechsel als Maß für die Aktivität von Neuronen oder Synapsen angesehen, da unter normalen Bedingungen Glukose die einzige Ressource für die Energieversorgung von Zellen darstellt (Jueptner und Weiller, 1995; Sokoloff, 1978; Sokoloff, 1981). Durch vorangegangene klinische PET-Untersuchungen mit ¹⁸FDG (2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose) konnten Beweise für einen regionalen neuronalen Hypometabolismus erbracht werden (Alexander et al., 2002; Edison et al., 2007; Engler et al., 2006). Es konnte ein Zusammenhang zwischen verminderten Stoffwechsel

und Verhaltensdefiziten bzw. Demenzgrad bei Morbus Alzheimer hergestellt werden (Minoshima et al., 1997; Reiman et al., 1996).

Aufgrund der oben benannten Veröffentlichungen wurde ein Hypometabolismus bei den ^{18}F FDG-PET-Untersuchungen der transgenen Tiere mit der schwedischen Mutation von humanen APP (Tg2576) erwartet. Anders als vermutet konnte in der vorliegenden Arbeit ein Hypermetabolismus bei den siebzehn Monate alten Tg2576-Mäusen festgestellt werden. Dieser signifikante transgene Effekt konnte im Alter von neunzehn Monaten aber nicht mehr gezeigt werden. Damit stehen die hier gezeigten Ergebnisse zwar im Widerspruch zu den Erwartungen eines Hypometabolismus, befinden sich aber im Einklang mit den Resultaten von zwei weiteren in der Firma Abbott Laboratories durchgeführten Studien. In einer weiteren PET-Untersuchung wurde die neuronale Aktivität in transgenen Tieren (Tg2576) und Wildtyp-Mäusen verschiedenen Alters analysiert (unveröffentlichte Daten). Hierbei konnte bei drei Monate alten transgenen Tieren ebenfalls ein signifikanter Hypermetabolismus nachgewiesen werden. Diese Erhöhung im Stoffwechsel verringerte sich im Verlauf des Alterungsprozesses und glich sich damit dem Metabolismus von Wildtyp-Mäusen an. Bestätigt wird die gesteigerte neuronale Aktivität der Tg2576-Mäuse auch durch eine immunhistochemische Studie. Hierbei konnte eine Überexpression des Arc-Proteins in hippocampalen Regionen (Stratum moleculare, Stratum radiatum, Stratum oriens) und im Neokortex bei neun und neunzehn Monate transgenen Tieren gezeigt werden (Nolte et al., 2008). Arc-Protein spielt eine Rolle bei der kognitiven Konsolidierung und bei dem A β -induzierten kognitiven Verfall und gilt deshalb als Parameter für die neuronale Aktivität (Palop et al., 2005).

Werden die Erkenntnisse der Studien zusammen betrachtet, können die hier gezeigten Ergebnisse kontrovers diskutiert werden. Zum einen könnte die verminderte neuronale Aktivität der neunzehn Monate alten Tg2576-Mäuse schlicht auf den normalen Altersprozess der Mäuse zurückzuführen sein, d.h. mit zunehmenden Alter vermindert sich die neuronale Aktivität. Andererseits konnte beim Vergleich der Basis- mit den finalen Ergebnissen auch eine Wirkung des anti-A β Oligomer Antikörpers A-887755 vermutet werden. Obwohl in beiden transgenen Gruppen eine Reduzierung der ^{18}F FDG-Signalstärke stattfand, fiel diese in der antikörperbehandelten Gruppe stärker aus als in der Kontrollgruppe. Trotz der stärkeren Normalisierung des Hypermetabolismus nach Antikörperbehandlung kann nicht ausgeschlossen werden, dass die reduzierten ^{18}F FDG-Signale teilweise auf eine generelle Immunaktivierung durch die Immunglobuline (IgG2a) zurückzuführen sind, denn A-887755 ist ebenfalls ein Isotyp des Immunglobulins. Für eine Abklärung dieses Aspekts hätte eine mit PBS behandelte Gruppe mitgeführt werden oder

der Zeitraum der chronischen Applikation verlängert werden müssen. Eventuell wirken aber auch die beiden Faktoren Alter und Behandlung bei neunzehn Monate alten Tieren zusammen, so dass keine eindeutige Aussage über die effektive Antikörperwirkung getroffen werden kann. Möglicherweise könnte anhand von jüngeren transgenen Tieren deutlichere Aussagen über die Wirkung des Antikörpers getroffen werden, da in jungen Tieren eine altershängige Abnahme der FDG-Aktivität weniger stark ausgeprägt ist.

Eine Erklärung warum in dem hier eingesetzten Tiermodell ein Hypermetabolismus aufgetreten ist, anstatt des erwarteten Hypometabolismus, könnte das Tiermodell an sich sein. Tiermodelle weisen trotz der gemeinsamen Überexpression von APP Differenzen zwischen den transgenen Stämmen und auch im Vergleich zu Morbus Alzheimer in Verhaltensuntersuchungen, elektrophysiologischen Studien, biochemischen oder pathohistologischen Merkmalen auf (Hsiao et al., 1996; Kalback et al., 2002; Kuo et al., 2001; Moechars et al., 1999; Schwab et al., 2004). Diese Differenzen könnten auf der Heterogenität von Morbus Alzheimer beruhen und/oder auf der Vielfalt an verwendeten Promotoren und Mäusestämmen. Daher wäre es sinnvoll den ^{18}F -FDG-Metabolismus sowohl bei weiteren transgenen Mäusen mit einer anderen APP-Mutation als auch bei doppelt oder dreifach transgenen Tieren zu untersuchen. Eine weitere Begründung für Hypermetabolismus bei APP transgenen Mäusen kann in der geringeren räumlichen Auflösung in einem mikroPET-Gerät liegen. Aufgrund der begrenzten räumlichen Auflösung kann die neuronale Aktivität nicht in einzelnen Arealen ermittelt werden, sondern nur im Gesamtgehirn. Im Gegensatz dazu wird bei klinischen PET-Studien gezielt nach Veränderungen in Regionen gesucht, die Lernen und Gedächtnis bzw. Motorik zugeordnet werden, wie z.B. der Hippocampus, und nicht das gesamte Gehirn betrachtet.

FDG ist ein 2-Deoxy-D-Glukose-Analogon (2-DG). Beide Substanzen werden über dieselben Glukosetransporter in die Zellen aufgenommen und über die gleichen Mechanismen metabolisiert. Aus diesem Grunde wurde die autoradiographische ^{14}C -2-DG-Methode zur Verifizierung der finalen PET-Ergebnisse genutzt. Wie erwartet korrelieren die Ergebnisse der beiden Methoden sehr gut miteinander und sind daher mit den Angaben von Toyama et al. (2004) konform. Aufgrund der geringeren Varianzen konnten im Gegensatz zur PET-Untersuchung bei der ^{14}C -2-DG-Technik höhere neuronale Aktivitäten bei transgenen Tieren gegenüber ihren Wildtypen nachgewiesen werden. Die hier gezeigten Ergebnisse der 2-DG-Aufnahmen stehen zusammen mit den PET-Ergebnissen im Widerspruch zu bekannter Literatur, nach der transgene Tiere mit einer Mutation von APP autoradiographisch einen reduzierten regionalen Metabolismus aufweisen (Reiman et al., 2000; Valla et al., 2002). Bei diesen Experimenten wurden allerdings alte transgene Tiere mit einer

anderen Mutation von APP (PDAPP-Mäuse) verwendet. Möglicherweise weisen diese PDAPP-Mäuse Unterschiede im altersabhängigen Glukosestoffwechsel gegenüber Tg2576-Mäusen auf.

Die Störung des zerebralen Metabolismus bei Morbus Alzheimer beschränkt sich indes nicht nur auf den Glukosestoffwechsel, sondern beeinflusst auch die mitochondriale Cytochrom-Oxidase C-Aktivität (COX; DeLaMonte et al., 2000; Maurer et al., 2000; Saraiva et al., 1985; Valla et al., 2001). COX ist ein integrales Transmembranprotein der Mitochondrienmembran und katalysiert den Elektronenübergang von Cytochrom C auf Sauerstoff (Wong-Riley, 1989). Daher spielt COX eine bedeutsame Rolle im oxidativen Metabolismus. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit ein histologischer Nachweis von COX-Aktivität durchgeführt.

In der Literatur wird von einer reduzierten COX-Aktivität von Morbus Alzheimer-Patienten berichtet, insbesondere im temporalen Kortex und im Hippocampus (Maurer et al., 2000; Parker und Parks, 1995). Ein möglicher Einflussfaktor könnte die Überexpression von APP sein, wobei der exakte Zusammenhang noch unklar ist (Crouch et al., 2005; Manczak et al., 2006; Takuma et al., 2005). Im Gegensatz zu Patienten wiesen transgene APP23-Mäuse eine höhere enzymatische Aktivität gegenüber ihren Kontrolltieren in verschiedenen Gehirnregionen auf, wie z.B. Gyrus dentatus, CA2, CA3 sowie diversen kortikalen Arealen (Strazielle et al., 2003). Abweichend dazu verhielten sich die hier untersuchten neunzehn Monate alten Tg2576-Mäuse. Aufgrund der hohen Varianzen konnte weder ein transgener Unterschied noch ein Einfluss der passiven Immunisierung mittels des anti-A β Oligomer Antikörpers A-887755 auf die neuronale mitochondriale Aktivität beobachtet werden. Damit bestätigen die hier gezeigten COX-Ergebnisse die Resultate der PET- und der 2-DG-Untersuchung. Unabhängig vom genetischen Hintergrund und der Behandlung konnten nur in neokortikalen und unterschiedlichen hippocampalen Schichten Aktivitätsunterschiede nachgewiesen werden. Die höchste COX-Aktivität trat dabei im Stratum moleculare des Hippocampus und im Neokortex auf, die geringste COX-Aktivität wurde im Stratum pyramidale und im Stratum lucidum des Hippocampus beobachtet. Dieser divergente mitochondriale Metabolismus spricht für eine höhere Konzentration von Mitochondrien im Gyrus dentatus und im Neokortex oder für eine Dysfunktion der Mitochondrien im Stratum pyramidale und im Stratum lucidum. Ein Vergleich der Ergebnisse vom Gyrus dentatus und vom Neokortex mit den kortikalen und hippocampalen Resultaten der 2-DG-Untersuchung ergab, dass diese beiden Regionen eine repräsentative Rolle bei dem neuronalen Stoffwechsel bei Tieren spielen.

Ein entscheidender Faktor für die COX-Aktivität scheint ebenso wie bei den FDG- und DG-Ergebnissen das Alter der Mäuse zu sein. Im Rahmen eines Vorversuchs zeigten sechs Monate alte Tg2576-Mäuse eine deutlich erhöhte COX-Aktivität (unveröffentlichte Daten), wohingegen zwei Monate alte Tg2576-Mäuse eine verringerte COX-Aktivität aufwiesen (Manczak et al., 2006). Im Gegensatz zu einer sechs Monate alten Tg2576-Maus weist ein zwei Monate altes Tier noch keine neuropathologischen Merkmale auf. Die beginnende Morbus Alzheimer-Pathologie könnte möglicherweise für eine entwicklungs- bzw. reifegrad-abhängige COX-Aktivität verantwortlich sein. Für diese Hypothese sprechen klinische Studien, in denen eine geringe COX-Aktivität bei Geburt, die maximale Aktivität während Wachstumsphase und Gehirnreifung und Abnahme der Aktivität mit dem Alter beobachtet wurde (Klee und Sokoloff, 1967; Wong-Riley, 1989).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Methoden (^{18}F FDG, ^{14}C -2-DG, COX) zur Bestimmung der neuronalen metabolischen Aktivität auf. Aus diesem Grund ist die tierexperimentelle PET-Untersuchung eine adäquate Option bei der Durchführung von präklinischen Studien zu Morbus Alzheimer. Allerdings verdeutlichen die Resultate ebenfalls, dass eine Wiederholung der Studie zur Bestimmung der Antikörperwirkung in jüngeren Tieren empfehlenswert ist. Generell sind die Ergebnisse hinsichtlich des neuronalen mitochondrialen Metabolismus bei transgenen Tieren derzeit noch diskrepant. Daher scheint eine Abklärung der enzymatischen Aktivität hinsichtlich Veränderungen im Alter und Variationen zwischen Tierstämmen sinnvoll zu sein.

4.8. Ausblick

Die Ergebnisse der präklinischen Studien in dieser Arbeit demonstrieren, dass die Verwendung von Tomographieräten zur *in vivo* Bestimmung der Nebenwirkung „Mikroblutung“ nach einer passiven Immunisierung und zur *in vivo* Untersuchung des Einflusses einer Immunisierung auf die neuronale Aktivität sehr gut geeignet sind. Aufgrund der begrenzten räumlichen Auflösung sowohl beim MRT als auch beim PET ist jedoch der präklinische *in vivo* Einsatz eingeschränkt. Dieses limitierte Auflösungsvermögen ist durch die geringfügige Größe der Gehirnstrukturen von Nagetieren, insbesondere bei Mäusen, begründet. Aus diesem Grunde muss das Auflösungsvermögen bei beiden Geräten durch weitere technische Entwicklungen deutlich gesteigert werden. Beim MRT könnte ein solcher technischer Fortschritt durch einen zunehmenden routinemäßigen Einsatz von leistungsstärkeren Magneten (11 oder 20 T; bisher eher selten in Präklinik), durch Optimierung des Spulensystems für eine erhöhte Empfindlichkeit bei der Detektion von Magnetresonanzen bei gleichzeitiger Reduzierung von Artefakten, durch die Entwicklung von Liganden mit einer

höheren Spezifität oder aber durch die Einführung neuer Kontrastmittel mit einem höheren Magnetresonanzpotential erreicht werden. Beim PET könnte eine Verbesserung der Auflösung durch eine Empfindlichkeitssteigerung erzielt werden, z.B. durch sensiblere und hochauflösendere Detektoren für die Registrierung von Photonen oder aber durch die Entwicklung von langlebigeren Radioliganden mit einer höheren Spezifität. Eine weitere Möglichkeit zur technologischen Verbesserung bietet das Kombinationsgerät von PET mit MRT. Dabei werden die MRT-Bilder als Hintergrund für die PET-Auswertungen verwendet, so dass konkretere Aussagen in Bezug auf die einzelnen anatomischen Strukturen getroffen werden können. Aufgrund der dadurch steigenden diagnostischen Effizienz wäre eine verstärkte Nutzung von Tomographien bei mehr bzw. neuen präklinischen Fragestellungen möglich.

Die Studienlage hinsichtlich der pathologischen Parameter von Morbus Alzheimer ist derzeit sehr widersprüchlich. Daher wären in Bezug auf einige der hier gezeigten Ergebnisse weiterführende Experimente zur Abklärung der Mechanismen sinnvoll. Zum Beispiel sollte eine vergleichende *in vivo* Untersuchung der neuronalen Aktivität mittels PET bei den unterschiedlichen Morbus Alzheimer-Tiermodellen oder eine longitudinale *in vivo* Studie über die Entwicklung der neuronalen Aktivität von der Geburt bis zum Tod anhand eines Tieres durchgeführt werden. Weiterhin könnte eine *in vivo* Abklärung des Einflusses einer Pharmakotherapie auf hämodynamische Prozesse bei transgenen Tieren mittels funktionalem MRT untersucht werden. Eine weitere ergänzende Untersuchung könnte *ex vivo* hinsichtlich des exakten Mechanismus für das Auftreten der bilateralen Kalzifizierungen in Mausmodellen speziell im Thalamus durchgeführt werden.

5. Literaturverzeichnis

Aisen PS, Gauthier S, Vellas B, Briand R, Saumier D, Laurin J, Garceau D (2007)

Alzhemed: A potential treatment for Alzheimer's disease.

Current Alzheimer Research: 4; 473-478

Alexander GE, Chen K, Pietrini P, Rapoport SI, Reiman EM (2002)

Longitudinal PET evaluation of cerebral metabolic decline in dementia: A potential outcome measure in Alzheimer's disease treatment studies.

The American Journal of Psychiatry: 159; 738-745

Alzheimer A (1907)

Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.

Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin: 64; 146-148

Arendt T, Schindler C, Bruckner MK, Eschrich K, Bigl V, Zedlick D, Marcova L (1997)

Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein ε4 allele.

The Journal of Neuroscience: 17; 516-529

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, VanHoesen GW (1991)

The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease.

Cerebral Cortex: 1; 103-116

Aschenbrenner N (2007)

Neue Bilder vom Gehirn: Kombination MR und PET.

Wissenschaftlicher Informationsdienst (<http://idw-online.de/pages/de/news210244>)

Atlas SW, Mark AS, Grossman RI, Gomori JM (1988)

Intracranial hemorrhage: gradient-echo MR imaging at 1,5 T. Comparison with spin-echo imaging and clinical applications.

Radiology: 168; 803-807

Auerbach ID, Sung SH, Wang Z, Vinters HV (2003)

Smooth muscle cells and the pathogenesis of cerebral microvascular disease ("angiomyopathies").

Experimental and Molecular Pathology: 74; 148-59

Bales KR, Tzavara ET, Wu S, Wade MR, Bymaster FP, Paul SM, Nomikos GG (2006)

Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-Aβ antibody.

The Journal of Clinical Investigation: 116; 825-832

Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzmann A, Gamma-Sosa M, Neve R, Robakis NK (2004)

PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations.

The EMBO Journal: 23; 2586-2596

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Lieberburg I, Motter R, Nguyen M, Soriano F, Vasquez N, Weiss K, Welch B, Seubert P, Schenk D, Yednock T (2000)

Peripherally administered antibodies against amyloid β-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer's disease.

Nature Medicine: 6; 916-919

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005)

Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease.

Journal of Neurochemistry: 95; 834-847

Belinson H, Lev D, Masliah E, Michaelson DM (2008)

Activation of the amyloid cascade in apolipoprotein E4 transgenic mice induces lysosomal activation and neurodegeneration resulting in marked cognitive deficits.

The Journal of Neuroscience: 28; 4690-4701

Benveniste H, Einstein G, Kim KR, Hulette C, Johnson GA (1999)

Detection of neuritic plaques in Alzheimer's disease by magnetic resonance microscopy.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 96; 14079-14084

Bickel H (2000)

Demenzsyndrom und Alzheimererkrankung: eine Schätzung des Krankenstandes und der jährlichen Neuerkrankungen.
Gesundheitswesen: 62; 211-218

Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, Maggio JE, Selkoe DJ (1996)

Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human brains.
The Journal of Biological Chemistry: 271; 32916-32922

Bush AI, Pettingell WH, Paradis MD, Tanzi RE (1994)

Modulation of A beta adhesiveness and secretase site cleavage by zinc.
The Journal of Biological Chemistry: 269; 12152-12158

Bush AI, Pettingell WH, DeParadis M, Tanzi RE, Wasco W (1994²)

The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily.
The Journal of Biological Chemistry: 269; 26618-2621

Callahan MJ, Lipinski WL, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC (2001)

Augmented senile plaques load in aged female β -Amyloid-Precursor-Protein-transgenic mice.
American Journal of Pathology: 158; 1173-1177

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, Mullan M (1991)

Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -Amyloid-Precursor-Protein gene.
Nature: 353; 844-846

Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, DiLuca M (2002)

[alpha]-secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients.
Molecular Medicine: 8; 67-74

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993)

Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.
Science: 261; 921-923

Cordonnier C, Al-Shahi Salman R, Wardlaw J (2007)

Spontaneous brain microbleeds: systematic review, subgroup analyses and standards for study design and reporting.
Brain: 130; 1988-2003.

Creeley C, Wozniak DF, Labruyere J, Taylor GT, Olney JW (2006)

Low doses of memantine disrupt memory in adult rats.
The Journal of Neuroscience: 12; 3923-3932

Crouch P, Blake R, Duce J, Ciccotosto G, Li Q, Barmham K, Curtain C, Cherny R, Cappai R, Dyrks T, Masters C, Trounce I (2005)

Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42.
The Journal of Neuroscience: 25; 672-679

Crystal HA, Davies P (2008)

Toward a plasma marker for Alzheimer disease: some progress, but still a long way to go.
Neurology: 70; 586-587

Cummings JL (2004)

Alzheimer's disease.
The New England Journal of Medicine: 351; 56-67

Deane R, DuYan S, Submmaryan RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003)

RAGE mediates Amyloid-beta-Peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain.

Nature Medicine: 9; 907-913

DeLaMonte SM, Luong T, Neely TR, Robinson D, Wands JR (2000)

Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease.

Laboratory Investigation: 80; 1323-1335

Delatour B, Dhenain M, Wu TD, El Tannir El Tayara N, Volk A, Quintana C (2006)

In vivo MRI detectable thalamic amyloid-associated aggregates developed by mutated APP/PS1 transgenic mice: what are they?

Poster Presentation ICAD Meeting Madrid

DeLeon MJ, Mosconi L, Blennow K, DeSanti S, Zinkowski R, Mehta PD, Pratico D, Tsui W, Saint Louis LA, Sobanska L, Brys M, Li Y, Rich K, Rinne J, Rusinek H (2007)

Imaging and CSF studies in the preclinical diagnosis of Alzheimer's disease.

Annals of the New York Academy of Sciences: 1097; 114-145

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001)

Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 98; 8850-8855

DeMattos RB, Boone LI, Hepburn DL, Parsadanian M, Bryan MT, Ness DK, Piroozzi KS, Holtzman DM, Bales KR, Gitter BD, Paul SM, Racke M (2004)

In vitro and in vivo characterization of beta-amyloid antibodies binding to cerebral amyloid angiopathy (CAA) and the selective exacerbation of CAA-associated microhemorrhage.

Neurobiology of Aging: 25; 577 (S2)

DeStrooper B (2007)

Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease.

EMBO Reports: 8; 141-146

Deutsche Alzheimer Gesellschaft (2006)

Die Epidemiologie der Demenz.

http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01_01.pdf

Dhenain M, Privat N, Duyckaerts C, Jacobs RE (2002)

Senile plaques do not induce susceptibility effects in T2*-weighted MR microscopic images.

NMR in Biomedicine: 15; 197-203

Dhenain M, El Tannir El Tayara N, Wu TD, Guégan M, Volk A, Quintana C, Delatour B (2009)

Characterization of in vivo MRI detectable thalamic amyloid plaques from APP/PS1 mice.

Neurobiology of Aging: 30; 41-53

Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM (2002)

Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model.

Nature Neuroscience: 5; 452-457

Donahue JE, Johanson CE (2008)

Apolipoprotein E, amyloid-beta, and blood-brain barrier permeability in Alzheimer disease.

Journal of Neuropathology and Experimental Neurology: 67; 261-270

Doody RS, Stevens JC, Beck C, Dubinsky RM, Kaye JA, Gwyther L, Mohs RC, Thal LJ, Whitehouse PJ, DeKosky ST, Cummings JL (2001)

Practice parameter: management of dementia (an evidence-based review): report of the quality standards subcommittee of the American academy of neurology.

Neurology: 56; 1154-1166

Driscoll M, Gerstbrein B (2003)

Dying for a cause: invertebrate genetics takes on human neurodegeneration.
Nature Review Genetics: 4; 181-194

Du AT, Schuff N, Kramer JH, Rosen HJ, Gorno-Tempini ML, Rankin K, Miller BL, Weiner MW (2007)

Different regional patterns of cortical thinning in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia.
Brain: 130;1159-66

Ebert U, VanDerAuwera I, Nolte M, Meyer A, Müller R, Mueller BK, Labkovsky B, VanLeuven F, Gross G, Schoemaker H, Sullivan JP, Hillen H (2008)

Therapeutic effects of passive immunization with an A β -oligomer specific antibody in APP transgenic mice.
Oral Presentation ICAD Meeting Chicago

Edison P, Archer HA, Hinz R, Pavese N, Tai YF, Hotton G, Cutler D, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ (2007)

Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study.
Neurology: 68; 482-483

El Tannir El Tayara N, Delatour B, LeCudennec C, Guégan M, Volk A, Dhenain M (2006)

Age-related evolution of amyloid burden, iron load, and MR relaxation times in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.
Neurobiology of Disease: 22; 199-208

Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, Wall A, Ringheim A, Langstroem B, Nordberg A (2006)

Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease.
Brain: 129; 2856-2866

Erzigkeit H (1989)

The SKT - a short cognitive performance test as an instrument for the assessment of clinical efficacy of cognitive enhancers.
In: Bergerner M, Reisberg B: Diagnosis and treatment of senile dementia; Springer Berlin Heidelberg New York: 164-174

Fazekas F, Kleiner R, Roob G, Kleiner G, Kapeller P, Schmidt R, Hartung HP (1999)

Histopathologic analysis of foci of signal loss on gradient-echo T2*-weighted MR images in patients with intracerebral hemorrhage: evidence of microangiopathy-related microbleeds.
American Journal of Neuroradiology: 20; 637-642

Folstein M, Folstein S, McHugh PR (1975)

Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician.
Journal of Psychiatric Research: 12; 189-198

Fraser H (1968)

Bilateral thalamic calcification in ageing mice.
The Journal of Pathology and Bacteriology: 96; 220-222

Friedland RP, Luxenberg JS, Koss E (1990)

A quantitative study of intracranial calcification in dementia of Alzheimer type.
International Psychogeriatrics: 2; 36-43

Furukawa K, Sopher BL, Rydel R, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP (1996)

Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted Amyloid-Precursor-Protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain.
Journal of Neurochemistry: 67; 1882-1896

Gellermann GP, Byrnes H, Striebinger A, Ullrich K, Mueller R, Hillen H, Barghorn S (2008)

A β -globulomers are formed independently of the fibril pathway.
Neurobiology of Disease: 30; 212-220

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J (1991)

Segregation of a missense mutation in the Amyloid-Precursor-Protein gene with familial Alzheimer's disease.

Nature: 349; 704-706

Goodman IJ (2008)

Practical utility of urinary assay in the diagnosis of Alzheimer's disease: AlzheimerAlert™.

Expert Reviews Molecular Diagnostics: 8; 21-28

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986)

Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 83; 4913-4917

Grundman M, Black R (2008)

Clinical trials of baponeuzumab, a beta-amyloid-targeted immunotherapy in patients with mild to moderate Alzheimer's disease.

Oral Presentation ICAD Meeting Chicago

Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993)

β -amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanism.

The Journal of Biological Chemistry: 268; 3021-3024

Haass C, Steiner H (2002)

Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases.

Trends in Cell Biology: 12; 556-562

Haass C, Selkoe DJ (2007)

Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide.

Nature Reviews Molecular Cell Biology: 8; 101-112

Hallauer JF, Schons M, Smala A, Berger K (2000)

Untersuchung von Krankheitskosten bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung in Deutschland.

Gesundheitsökonomie & Qualitätsmanagement: 5; 73-79

Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992)

Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase.

Neuroscience Letters: 147; 58-62

Hanyu H, Tanaka Y, Shimizu S, Takasaki M, Abe K (2003)

Cerebral microbleeds in Alzheimer's disease.

Journal of Neurology: 250; 1496-1497

Hardy JA, Higgins GA (1992)

Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.

Science: 256; 184-185

Hardy J, Selkoe DJ (2002)

The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.

Science: 297; 353-356

Hardy J (2006)

Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal.

Journal of Alzheimer's Disease: 9; 151-153

Hatashita S, Yamasaki H, Shionzaki N (2008)

Imaging of cortical amyloid load and cerebral glucose metabolism in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.

Poster Presentation ICAD Meeting Chicago

Herholz K (2003)

PET studies in dementia.

Annals of Nuclear Medicine: 17; 79-89

Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Sato K, Sasamoto K, Saido TC (2005)

¹⁹F and ¹H MRI detection of amyloid β plaques in vivo.

Nature Neuroscience: 8; 527-533

Hooijmans CR, VanDerZee CE, Dederen PJ, Brouwer KM, Reijmer YD, VanGroen T, Broersen LM, Lütjohann D, Heerschap A, Kiliaan AJ (2008)

DHA and cholesterol containing diets influence Alzheimer-like pathology, cognition and cerebral vasculature in APP(swe)/PS1(dE9) mice.

Neurobiology of Disease: 33; 482-498

Hornsten A, Lieberthal J, Fadia S, Malins R, Ha L, Xu X, Daigle I, Markowitz M, O'Connor G, Plasterk R, Li C (2007)

APL-1, a Caenorhabditis elegans protein related to the human beta-Amyloid-Precursor-Protein, is essential for viability.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 104; 1971-1976

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996)

Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.

Science: 274; 99-102

Ikonomovic MD, Klunk WE, Abrahamson EE, Mathis CA, Price JC, Tsopelas ND, Lopresti BJ, Ziolko S, Bi W, Paljug WR, Debnath ML, Hope CE, Isanski BA, Hamilton RL, DeKosky ST (2008)

Post-mortem correlates of in vivo PIB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease.

Brain: 131; 1630-1645

Jack CR, Garwood M, Wengenack TM, Borowski B, Curran GL, Lin J, Adriany G, Gröhn OHJ, Grimm R, Poduslo JF (2004)

In vivo visualization of Alzheimer's amyloid plaques by magnetic resonance imaging in transgenic mice without a contrast agent.

Magnetic Resonance in Medicine: 52; 1263-1271

Jack CR, Wengenack TM, Reyes DA, Garwood M, Curran GL, Borowski BJ, Lin J, Preboske GM, Holasek SS, Adriany G, Poduslo JF (2005)

In vivo magnetic resonance microimaging of individual amyloid plaques in Alzheimer's transgenic mice.

The Journal of Neuroscience: 25; 10041-10048

Jack CR, Weigand SD, Shiung MM, Przybelski SA, O'Brien PC, Gunter JL, Knopman DS, Boeve BF, Smith GE, Petersen PC (2008)

Atrophy rates accelerate in amnesic mild cognitive impairment.

Neurology: 70; 1740-1752

Janus C, Pearson J, McLaurin JA, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HTJ, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St. George-Hyslop P, Westway D (2000)

A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease.

Nature: 408; 979-982

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993)

The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Biochemistry: 32; 4693-4697

Jellinger KA (2002)

Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update.

Journal of Neural Transmission: 109; 813-836

Jueptner M, Weiller C (1995)

Does measurement of regional cerebral blood flow reflect synaptic activity? Implications for PET and fMRI.

Neuroimage: 2; 148-256

Kalaria RN (2002)

Small vessel disease and Alzheimer's dementia: pathological considerations.

Cerebrovascular Diseases: 13; 48-52

Kalback W, Watson MD, Kokjohn TA, Kuo YM, Weiss N, Luehrs DC, Lopez J, Brene D, Sisodia SS, Staufenbiel M, Emmerling M, Roher AE (2002)

APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques.

Biochemistry: 41; 922-928

Kalueff A, Loseva E, Haapasalo H, Rantala I, Keranen J, Lou YR, Minasyan A, Keisala T, Miettinen S, Kuuslahti M, Tuchimaa P (2006)

Thalamic calcification in vitamin D receptor knockout mice.

Neuroreport: 17; 717-721

Katzman R, Terry R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A (1988)

Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques.

Annals of Neurology: 23; 138-144

Kim KM (1995)

Apoptosis and calcification.

Scanning Microscopy: 9; 1137-1178

Klee CB, Sokoloff L (1967)

Changes in D-beta-hydroxybutyric dehydrogenase activity during brain maturation in the rat.

The Journal of Biological Chemistry: 242; 3880-3883

Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Långström B. (2004)

Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B.

Annals of Neurology: 55, 306-319

Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkien N, Small GW, Miller B, Stevens JC (2001)

Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review): report of the quality standards subcommittee of the American academy of neurology.

Neurology: 56; 1143-1153

Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM (2001)

Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validations of the boston criteria.

Neurology: 56; 537-539

Kojro E, Fahrenholz F (2005)

The non-amyloidogenic pathway: structure and function of α -secretases.

Sub-cellular Biochemistry: 38; 105-127

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986)

Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 83, 4044-4048

Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, Kawarabayashi T, Younkin L, Hyman BT, Younkin S, Ashe KH (2002)

Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease.

Journal of Neuroscience: 22; 6331-6335

Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ, Schellenberg GD (2003)

Neurodegeneration and defective neurotransmission in a Caenorhabditis elegans model of tauopathy.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 100; 9980-9985

Krämer G (2000)

Alzheimer-Krankheit: Antworten auf die wichtigsten Fragen.

Trias Verlag; Stuttgart: 4. Auflage

Kuo YM, Kokjohn TA, Beach TG, Sue LI, Brune D, Lopez JC, Kalback WM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufienbiel M, Roher AE (2001)

Comparative analysis of amyloid-beta chemical structure and amyloid plaque morphology of transgenic mouse and Alzheimer's disease brains.

The Journal of Biological Chemistry: 276;12991-12998

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998)

Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 95; 6448-6453

Lannfelt L, Basun H, Wahlund LO, Rowe BA, Wagner SL (1995)

Decreased alpha-secretase-cleaved Amyloid-Precursor-Protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease.

Nature Medicine: 1; 829-832

Lannfelt L, Blennow K, Zetterberg H, Batsman S, Ames D, Harrison J, Masters CL, Targum S, Bush AI, Murdoch R, Wilson J, Ritchie CW (2008)

Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomized, placebo-controlled trial.

Lancet Neurology: 7; 779-786

Lau JC, Lerch JP, Sled JG, Henkelman RM, Evans AC, Bedell BJ (2008)

Longitudinal neuroanatomical changes determined by deformation-based morphometry in a mouse model of Alzheimer's disease.

Neuroimage: 42; 19-27

Lee SP, Falangola MF, Nixon RA, Duff K, Helpert JA (2004)

Visualization of beta-amyloid plaques in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease using MR microscopy without contrast reagents.

Magnetic Resonance in Medicine: 52; 538-544

Legleiter J, Czille DL, Gitter B, DeMattos RB, Holtzman DM, Kowalewski T (2004)

Effect of different anti-A β antibodies on A β fibrillogenesis as assessed by atomic force microscopy.

Journal of Molecular Biology: 335; 997-1006

Linfante I, Llinas RH, Caplan LR, Warach S (1999)

MRI features of intracerebral hemorrhage within 2 hours from symptom onset.

Stroke: 30; 2263-2267

Lomakin A, Chung DS, Benedek GB, Kirschner DA, Teplow DB (1996)

On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 93; 1125-1129

Lorenzo A, Yankner BA (1994)

β -amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 91; 12243-12247

Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001)

Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice.

The EMBO Journal: 20; 27-39

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shern Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999)

Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease.

The American Journal of Pathology: 155; 853-862

Mackic JB, Stins M, McComb JG, Calero M, Ghiso J, Kim KS, Yan SD, Stern D, Schmidt AM, Frangione B, Zlokovic BV (1998)

Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1-40. Asymmetric binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer.

The Journal of Clinical Investigation: 102; 734-743

Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M, Suhara T (2007)

Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography.

The Journal of Neuroscience: 27; 10957-10968

Mahy N, Prats A, Riveros A, Andrés N, Bernal F (1999)

Basal ganglia calcification induced by excitotoxicity: an experimental model characterised by electron microscopy and X-ray microanalysis.

Acta Neuropathologica: 98; 217-225

Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006)

Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression.

Human Molecular Genetics: 15; 1437-1449

Mann D (1988)

The pathological association between down syndrome and Alzheimer disease.

Mechanisms of Ageing and Development: 43; 99-136

Marota JJA, Ayata C, Moskowitz MA, Weisskoff RM, Rosen BR, Mandeville JB (1999)

Investigation of the early response to rat forepaw stimulation.

Magnetic Resonance in Medicine: 41; 247-252

Mathis CA, Bacskai BJ, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Hyman BT, Holt DP, Wang Y, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE (2002)

A lipophilic thioflavin-T derivative for positron emission tomography (PET) imaging of amyloid in brain.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters: 12; 295-298

Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Liederburg I, Rydel RE (1993)

Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -Amyloid-Precursor-Protein.

Neuron: 10; 243-254

Mattson MP (1994)

Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contribution of β -Amyloid-Precursor-Protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise.

Annals of the New York Academy of Science: 747; 50-76

Maurer I, Zierz S, Möller HJ (2000)

A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer's disease patients.

Neurobiology of Aging: 21; 455-462

McGeer PL, Kamo H, Harrop R, Li DKB, Tuokko H, McGeer EG, Adam MJ, Ammann W, Beattie BL, Calne DB, Martin WRW, Pate BD, Rogers JG, Ruth TJ, Sayre CI, Stoessl AJ (1986)

Positron emission tomography in patients with clinically diagnosed Alzheimer's disease.

Canadian Medical Association Journal: 134; 597-607

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999)

Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.

Annals of Neurology: 46; 860-866

Melnikova I (2007)

Therapies for Alzheimer's disease.

Nature Reviews-Drug Discovery: 6; 341-342

Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998)

Memory-enhancing effects of secreted forms of the β -Amyloid-Precursor-Protein in normal and amnesic mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 95; 12683-12688

Mielke R, Herholz K, Grond M, Kessler J, Heiss WD (1994)

Clinical deterioration in probable Alzheimer's disease correlates with progressive metabolic impairment of association areas.

Dementia: 5; 36-41

Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE (1997)

Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease.

Annals of Neurology: 42; 85-94

Miyasaka T, Ding Z, Gengyo-Ando K, Oue M, Yamaguchi H, Mitani S, Ihara Y (2005)

Progressive neurodegeneration in *C. elegans* model of tauopathy.

Neurobiology Disease: 20; 372-383

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reversé D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, VanDenHaute C, Checler F, Godaux E, Cordell B, VanLeuven F (1999)

Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of Amyloid-Precursor-Protein in brain.

The Journal of Biological Chemistry: 274; 6483-6492

Mohs RC, Rosen WG, Davis KL (1983)

The Alzheimer's disease assessment scale: an instrument for assessing treatment efficacy.

Psychopharmacology Bulletin: 19; 448-450

Mori E, Lee K, Yasuda M, Hashimoto M, Kazui H, Hirono N, Matsui M (2002)

Accelerated hippocampal atrophy in Alzheimer's disease with apolipoprotein E epsilon4 allele.

Annals of Neurology: 51; 209-214

Mucke L, Abraham CR, Masliah E (1996)

Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic mice.

Annals of the New York Academy of Sciences: 777; 82-88

Mueggler T, Baumann D, Rausch M, Staufenbiel M, Rudin M (2003)

Age-dependent impairment of somatosensory response in the Amyloid-Precursor-Protein 23 transgenic mouse model of Alzheimer's disease.

The Journal of Neuroscience: 23; 8231-8236

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfeldt L (1991)

A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid.

Nature Genetics: 1; 345-347

Murell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991)

A mutation in the Amyloid-Precursor-Protein associated with hereditary Alzheimer's disease.

Science: 254; 97-99

Murray AD, Staff RT, Ahearn TS, Bentham P, Seng KM, Wischik C (2008)

Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with Rember™ changes glucose metabolism in the medial temporal lobes in mild and moderate Alzheimer's disease (AD).

Poster ICAD Meeting Chicago

Muyllaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, Devijver H, Croes S, Dewachter I, VanLeuven F (2008)

Glycogen synthase kinase-3b, or a link between amyloid and tau pathology.

Genes, Brain and Behavior: 7; 57-66

Myers R, Hume S (2002)

Small animal PET.

European Neuropsychopharmacology: 12; 545-555

Nakata Y, Shiga K, Yoshikawa K, Mizuno T, Mori S, Yamada K, Nakajima K (2002)

Subclinical brain hemorrhages in Alzheimer's disease: evaluation by magnetic resonance T2*-weighted images.

Annals of the New York Academy of Sciences: 977:169-72

Narita K, Murata T, Ito T, Murata I, Fukutani Y, Tsuji Y, Wada Y (2002)

A case of neurofibrillary tangles with calcification.
Psychiatry and Clinical Neurosciences: 56; 117-120

Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davies KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD (2000)

Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline.
The Journal of American Medical Association: 283; 1571-1577

Nighoghossian N, Hermier M, Adeleine P, Blanc-Lasserre K, Derex L, Honnorat J, Philippeau F, Dugor JF, Froment JC, Trouillas P (2002)

Old microbleeds are a potential risk factor for cerebral bleeding after ischemic stroke: a gradient-echo T2*-weighted brain MRI study.
Stroke: 33; 735-742

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condrón MM, Axelman K, Forsell C, Sten C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L (2001)

The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation.
Nature Neuroscience: 4; 887-893

Nimmrich V, Szabo R, Nyakas C, Granic I, Reymann KG, Schröder UH, Gross G, Schoemaker H, Wicke K, Möller A, Luiten P (2008)

Inhibition of calpain prevents N-Methyl-D-Aspartate-induced degeneration of the nucleus basalis and associated behavioral dysfunction.
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics: 327; 343-352

Nixon RA (2003)

The calpains in aging and aging-related diseases.
Ageing Research Reviews: 2; 407-418

Nolte MW, Jongen-Rêlo AL, Meyel A, Gross G, Schoemaker H, Ebert U (2008)

Age-dependent alterations in Arc translation and cellular distribution in the brain of Tg2576 mice.
Poster ICAD Meeting Chicago

Nordberg A (2007)

Amyloid plaque imaging in vivo: current achievement and future prospects.
European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: 35; 46-50

Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R, Koch M, Fazekas G, Kapeller P (1996)

MR of cerebral abnormalities concomitant with primary intracerebral hematomas.
American Journal of Neuroradiology: 17; 573-578

Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C (2003)

Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A β 42 immunization.
Neurology: 61; 46-54

Oswald WD, Fleischmann UM (1986)

NAI-Nürnbergers Altersinventar.
Psychologisches Institut Universität Erlangen-Nürnberg

Palmer AM, Stratmann GC, Procter AW, Bowen DM (1988)

Possible neurotransmitter basis of behavioral changes in Alzheimer's disease.
Annals of Neurology: 23; 616-620

Palop JJ, Chin J, Bien-Ly N, Massaro C, Yeung BZ, Yu GQ, Mucke L (2005)

Vulnerability of dentate granule cells to disruption of arc expression in human Amyloid-Precursor-Protein transgenic mice.
The Journal of Neuroscience: 25; 9686-9693

Pappas BA, Bayley PJ, Bui BK, Hansen LA, Thal LJ (2000)

Choline acetyltransferase activity and cognitive domain scores of Alzheimer's patients.
Neurobiology of Aging: 21; 11-17

Parker WD, Parks JK (1995)

Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization.
Neurology: 45; 482-486

Paxinos G, Franklin KBJ (2001)

The mouse brain in stereotaxic coordinates (Second Edition).
Academic Press London UK

Paxinos G, Watson C (1998)

The rat brain in stereotaxic coordinates (Fourth Edition).
Academic Press London UK

Peterson C, Ratan R, Shelanski M, Goldman J (1986)

Changes in calcium homeostasis during aging and Alzheimer's disease.
Annals of the New York Academy of Sciences: 568; 262-270

Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M (2002)

Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy.
Science: 298; 1379

Poduslo JF, Wengenack TM, Curran GL, Wisniewski T, Sigurdsson EM, Macura SI, Borowski BJ, Jack CR (2002)

Molecular targeting of Alzheimer's amyloid plaques for contrast-enhanced magnetic resonance imaging.
Neurobiology of Disease: 11; 315-329

Pride M, Seubert P, Grundman M, Hagen M, Eldrige J, Black RS (2008)

Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis.
Neurodegenerative Disease: 5; 194-196

Racke MM, Bryan MT, DeMattos RB (2004)

Binding differences between Abeta antibodies in CAA containing vessels from PDAPP mice.
Neurobiology of Aging: 25; 588 (S2)

Racke MM, Boone LI, Hepburn DL, Parsadainian M, Bryan MT, Ness DK, Piroozzi KS, Jordan WH, Brown DD, Hoffmann WP, Holtzman DM, Bales KR, Gitter BD, May PC, Paul SM, DeMattos RB (2005)

Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in Amyloid-Precursor-Protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta.
The Journal of Neuroscience: 25; 629-636

Ramonet D, DeYebra L, Fredriksson K, Bernal F, Ribalta T, Mahy N (2006)

Similar calcification process in acute and chronic human brain pathologies.
Journal of Neuroscience Research: 83; 147-156

Reiman EM, Caselli RJ, Yun LS, Chen K, Bandy D, Minoshima S, Thibodeau SN, Osborne D (1996)

Preclinical evidence of Alzheimer's disease in persons homozygous for the epsilon 4 allele for apolipoprotein E.
The New England Journal of Medicine: 334; 752-758

Reiman EM, Uecker A, Gonzalez-Lima F, Minear D, Chen K, Callaway NL, Berndt JD, Games D (2000)

Tracking Alzheimer's disease in transgenic mice using fluorodeoxyglucose autoradiography.
Neuroreport: 11; 987-991

Rensink AAM, DeWaal RMW, Kremer B, Verbeek MM (2003)

Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy.
Brain Research Reviews: 43; 207-223

Rinck PA, Zink C (2005)

Magnetresonanztomographie.
ABW Wissenschaftsverlag; Berlin

Ringman JM, Younkin SG, Pratico D, Seltzer W, Cole GM, Geschwind DH, Rodriguez-Agudelo Y, Schaffer B, Fein J, Sokolow S, Rosario ER, Gylys KH, Varpetian A, Medina LD, Cummings JL (2008)

Biochemical markers in persons with preclinical familial Alzheimer disease.
Neurology: 71; 85-92

Ripoll MA, Stenorg A, Sonninen P, Terent A, Raininko R (2004)

Detection and appearance of intraparenchymal haematomas of the brain at 1.5 T with spin-echo, FLAIR and GE sequences: poor relationship to the age of the haematoma.
Neuroradiology: 46; 435-443

Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR (1996)

Morphology and toxicity of A β 1(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease.
The Journal of Biological Chemistry: 271; 20631-20635

Saddichha S, Pandey V (2008)

Alzheimer's and non-Alzheimer's dementia: a critical review of pharmacological and nonpharmacological strategies.
American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias: 23; 150-160

Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Marky A, Lenting PJ, Wu Z, Zarcone T, Goate A, Mayo K, Perlmutter D, Coma M, Zhong Z (2007)

Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors.
Nature Medicine: 13; 1029-1031

Saraiva AA, Borges MM, Madeira MD, Tavares MA, Paula-Barbosa MM (1985)

Mitochondrial abnormalities in cortical dendrites from patients with Alzheimer's disease.
Journal of Submicroscopic Cytology: 17; 459-464

Sato K, Higuchi M, Iwata N, Saido TC, Sasamoto K (2004)

Fluoro-substituted and ^{13}C -labeled styrylbenzene derivatives for detecting brain amyloid plaques.
European Journal of Medicinal Chemistry: 39; 573-578

Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, George-Hyslop P, Pericak-Vance M, Joo S, Rosi B, Gusella J, Crapper-MacLachlan D, Alberts M, Hulette C, Crain B, Goldgaber D, Roses A (1993)

Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.
Neurology: 43; 1467-1472

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano, F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999)

Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse.
Nature: 400; 173-177

Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Craig BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD (1993)

Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 90; 9649-9653

Schwab C, Hosokawa M, McGeer PL (2004)

Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease.
Experimental Neurology: 188; 52-64

Schwaiger M, Ziegler SI, Nekolla SG (2005)

MR-PET: Combining function, anatomy, and more.
Molecular Imaging (Siemens Medical solutions): 25-30

Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund MO, Winblad B, Benedikz E (2000)

Levels of alpha- and beta-secretase cleaved Amyloid-Precursor-Protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients.
Neuroscience Letters: 278; 169-172

Selkoe DJ (2001)

Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.
Physiological Reviews: 81; 741-766

Selkoe DJ (2002)

Alzheimer's disease is a synaptic failure.
Science: 298; 789-791

Seubert P, Barbour R, Khan K, Motter R, Tang P, Kholodenko D, Kling K, Schenk D, Johnson-Wood K, Schröter S, Gill D, Jacobsen JS, Pangalos M, Basi G, Games D (2008)

Antibody capture of soluble A β does not reduce cortical A β amyloidosis in the PDAPP mouse.
Neurodegenerative Diseases: 5; 65-71

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007)

Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway.
Journal of Neuroscience: 27; 2866-2875

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008)

Soluble amyloid β -protein dimers isolated directly from Alzheimer's disease patients potently impair synaptic plasticity and memory.
Oral Presentation ICAD Meeting Chicago

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000)

Clearance of Alzheimer's amyloid-ss (1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier.
The Journal of Clinical Investigation: 106; 1489-1499

Silverman DH, Small GW, Chang CY, Kung de Aburto MA, Chen W, Czernin J, Rapoport SI, Pietrini P, Alexander GE, Schapiro MB, Jagust WJ, Hoffmann JM, Welsh-Bohmer KA, Alavi A, Clark CM, Salomon E, DeLeon MJ, Mielke R, Cummings JL, Kowell AP, Gambhir SS, Hoh CK, Phelps ME (2001)

Positron emission tomography in evaluation of dementia: regional brain metabolism and long-term outcome.
Journal of the American Medical Association: 286; 2120-2127

Sinjoanu RC, Kleinschmidt S, Bitner RS, Brioni JD, Moeller A, Ferreira A (2008)

The novel calpain inhibitor A-705253 potently inhibits oligomeric beta-amyloid-induced dynamin 1 and tau cleavage in hippocampal neurons.
Neurochemistry International: 53; 79-88

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, DesRosiers MH, Patlak CS, Petigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977)

The (14C) deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat.
Journal of Neurochemistry: 28; 897-916

Sokoloff L (1978)

Local cerebral energy metabolism: its relationships to local functional activity and blood flow.
Ciba Foundation Symposium: 56; 171-197

Sokoloff L (1981)

Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system.
Federation Proceedings: 40; 2311-2316

Stopa EG, Butala P, Salloway S, Johanson CE, Gonzalez L, Tavares R, Hovanessian V, Hulette CM, Vitek MP, Cohen RA (2008)

Cerebral cortical arteriolar angiopathy, vascular beta-amyloid, smooth muscle actin, Braak stage, and APOE genotype.
Stroke: 39; 814-821

Strazielle C, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Laonde R (2003)

Regional brain cytochrome oxidase in β -Amyloid-Precursor-Protein transgenic mice with the swedish mutation.

Neuroscience: 118; 1151-1163

Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Luddy J, Trillat AC, Stern DM, Arancio O, Yan SS (2005)

ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction.

The FASEB Journal: 19; 598-598

Tõugu V, Karafin A, Palumaa P (2008)

Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's Amyloid-beta-Peptide.

Journal of Neurochemistry: 104; 1249-1259

Townsend M, Cleary JP, Mehta T, Hofmeister J, Lesne S, O'Hare E, Walsh DM, Selkoe DJ (2006)

Orally available compound prevents deficits in memory caused by the Alzheimer amyloid- β oligomers.

Annals of Neurology: 60; 668-676

Toyama H, Ichise M, Liow JS, Modell KJ, Vines DC, Esaki T, Cook M, Seidel J, Sokoloff L, Green MV, Innis RB (2004)

Absolute quantification of regional cerebral glucose utilization in mice by 18F-FDG small animal PET scanning and 2-14C-DG autoradiography.

The Journal of Nuclear Medicine: 45; 1398-1405

Valla J, Berndt JD, Gonzalez-Lima F (2001)

Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration.

Journal of Neurosciences: 21; 4923-4930

Valla J, Vhen K, Berndt JD, Gonzalez-Lima F, Cherry SR, Games D, Reiman EM (2002)

Effects of image resolution on autoradiographic measurements of posterior cingulate activity in PDAPP mice: implications for functional brain imaging studies of transgenic mouse models of Alzheimer's disease.

Neuroimage: 16; 1-6

VanDorpe J, Smeijers L, Dewachter I, Nuyens D, Spittaels K, VanDenHaute C, Mercken M, Moechars D, Laenen I, Kuiperi C, Bruynseels K, Tesseur I, Loos R, Vanderstichele H, Checler F, Sciot R, VanLeuven F (2000)

Prominent cerebral amyloid angiopathy in transgenic mice overexpressing the London mutant of human APP in neurons.

American Journal of Pathology: 157; 1283-1298

Vanhoutte G, Dewachter I, Borghgraef P, VanLeuven F, VanDerLinden A (2005)

Noninvasive in vivo MRI detection of neuritic plaques associated with iron in APP[V717I] transgenic mice, a model for Alzheimer's disease.

Magnetic Resonance in Medicine: 53; 607-613

Vermersch P, Leys D, Pruvo JP, Clarisse J, Petit H (1992)

Parkinson's disease and basal ganglia calcifications: prevalence and clinico-radiological correlations.

Clinical Neurology and Neurosurgery: 94; 213-217

Viswanathan A, Chabriat H (2006)

Cerebral microhemorrhage.

Stroke: 37; 550-555

Wadghiri YZ, Sigurdsson EM, Sadowski M, Elliott JI, Li Y, Scholtzova H, Tang CY, Aguinaldo G, Pappolla M, Duff K, Wisniewski T, Turnbull DH (2003)

Detection of Alzheimer's amyloid in transgenic mice using magnetic resonance imaging.

Magnetic Resonance in Medicine: 50; 293-302

Wadghiri YZ, Sigurdsson EM, Wisniewski T, Turnbull DH (2005)

Magnetic resonance imaging of amyloid plaques in transgenic mice.

Methods in Molecular Biology: 299; 365-379

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002)
Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vitro*.

Nature: 416; 535-539

Walsh DM (2008)

Synthetic Abeta dimers and Abeta dimers from CSF and Alzheimer brain disrupt synaptic plasticity and memory.

Poster ICAD Meeting Chicago

Webster S, Rogers J (1996)

Relative efficacies of amyloid beta (A beta) binding proteins in A beta aggregation.

Journal of Neuroscience Research: 46; 58-66

Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D (2004)

Passive immunotherapy against A-beta in aged APP-transgenic mice reverse cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage.

Journal of Neuroinflammation: 1; 24

Wilcock DM, Alamed J, Gottschall PE, Grimm J, Rosenthal A, Pons J, Ronan V, Symmonds K, Gordon MN, Morgan D (2006)

Deglycosylated anti-amyloid-beta antibodies eliminate cognitive deficits and reduce parenchymal amyloid with minimal vascular consequences in aged Amyloid-Precursor-Protein transgenic mice.

The Journal of Neurosciences: 26; 5340-5346

Wilcock DM, Jantzen PT, Li Q, Morgan D, Gordon MN (2007)

Amyloid- β vaccination, but not nitro-nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment, increases vascular amyloid and microhemorrhage while both reduce parenchymal amyloid.

Neuroscience: 144; 950-960

Wilcock GK, Black SE, Hendrix SB, Zavitz KH, Swabb EA, Laughlin MA (2008)

Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial.

Lancet Neurology: 7; 483-493

Wischik CM, Bentham P, Wischik DJ, Seng KM (2008)

Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with RemberTM arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks.

Oral Presentation ICAD Meeting Chicago

Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (2001)

Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles.

Science: 293; 711-714

Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberley WT, Selkoe DJ (1999)

Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ -secretase activity.

Nature: 398; 513-517

Wong-Riley MT (1989)

Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity.

Trends in Neurosciences: 12; 94-101

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996)

RAGE and Amyloid-beta-Peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease.

Nature: 382; 685-691

Ye S, Huang Y, Müllendorff K, Dong L, Giedt G, Meng EC, Cohen FE, Kuntz ID, Weisgraber KH, Mahley RW (2005)

Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid β peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: 102; 18700-18705

Zhang J, Yarowsky P, Gordon MN, DiCarlo G, Munireddy S, VanZijl PC, Mori S (2004)
Detection of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease by magnetic resonance imaging.
Magnetic Resonance in Medicine: 51; 452-457

6. Anhang

6.1. Geräte und Materialien

6.1.1. Ermittlung der Auflösung von Blutablagerungen im MRT

Geräte/Materialien	Bezeichnung	Hersteller/Firma
Sprague-Dawley-Ratten		Charles Rivers Laboratories; Worcester, MA, USA
Käfige	Ventilated Racks, 10,25x19x8 inches	Alternative Design – Lab Animal Housing Solutions™; Siloam Springs, AR, USA
Futter	Harlan Global Diet 20018	Harlan Teklad; Madison, WI, USA
Ketamin	Ketaset	Fort Dodge Animal Health; Fort Dodge, IA, USA
Medetomidin	Dormitor	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
Antidot®	Antisedan (Medetomidin Reversing-Agent)	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
Stereotakt	Lab Standard™	Firma Stölting Co.; Wood Dale, IL, USA
Injektionsnadeln	23 Gauge Intramedia Lür Stub Adapter und 23G1 Precision Glide Needel	Becton Dickson, Diagnostic Systems; Franklin Lakes, NY, USA
Polyethylenschlauch	Intramedic™ Polyethylenschlauch; nicht steril; PE-50	Becton Dickson, Diagnostic Systems; Franklin Lakes, NY, USA
Hamiltonspritze	Microliter™ 7000.5	Hamilton Company; Reno, NV, USA
MRT	Bruker Spectrometer	Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland
Paravision-Konsole		Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland
Kopfhalter	Animal Holder (Head Holder)	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Körperrohre	Animal Holder (Body Tube)	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Empangsspule	3.2 cm x 3.6 cm	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Sendespule	110 mm	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Peristaltikpumpe	Masterflex L/STM	Cole-Parmer Instrument Co.; Vernon Hills, IL, USA
PBS	GIBCO 10010	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, USA
neutralgepuffertes Formalin	10 %	Harleco* Histology and Cytology Products; Gibbstown, NY, USA
Sucrose	Ultra Centrifugation Grade, Fisher BioReagents	Fisher Scientific Chemical Division; Fair Lawn, NJ, USA
Gefriermikrotom	Mikrotom-Modell 1206 und Frigomobil	Reichert-Jung; Nussloch, Deutschland
Kalium-Ferrocyanid II		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Salzsäure		J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Neutralrot		FD Neuro Technologies; Baltimore, MD, USA
X-Tra-Solv®		Medita Medizintechnik; Burgdorf, Deutschland
Ultra Kitt®		J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Axioplan2 Imaging		Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, Deutschland
NeuroLucida		MicroBrightField, Inc.; Williston, VT, USA

6.1.2. Nachweis von Mikroblutungen nach chronischer A β -Antikörperbehandlung

Geräte/Materialien	Bezeichnung	Hersteller/Firma
Mäuse (Tg2576)	Tg2576 [B6;SJL-Tg (APP/SWE2576Kha)]	Taconic Farms, Inc.; Germantown, NY, USA
Käfige	Ventilated Racks, 6x11x6 inches	Alternative Design – Lab Animal Housing Solutions™; Siloam Springs, AR, USA
Futter	Harlan Global Diet 20018Sx	Harlan Teklad; Madison, WI, USA
Nestlets	NES3600	Ancare Corporation; Bellmore, NY, USA
Ketamin	Ketaset	Fort Dodge Animal Health; Fort Dodge, IA, USA
Medetomidin	Dormitor	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
Antidot®	Antisedan (Medetomidin Reversing-Agent)	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
MRT	Bruker Spectrometer	Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland
Paravision-Konsole		Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland

Kopfhalter Halter für kleine Nagetiere	Animal Holder (Head Holder) Animal Holder (Holder for small rodents)	InsightMRI; Worcester, MA, USA InsightMRI; Worcester, MA, USA
Empfangsspule Sendespule Peristaltikpumpe PBS neutralgepuffertes Formalin	3.2 cm x 3.6 cm 110 mm Masterflex L/STM GIBCO 10010 10 %	InsightMRI; Worcester, MA, USA InsightMRI; Worcester, MA, USA Cole-Parmer Instrument Co.; Vernon Hills, IL, USA Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, USA Harleco* Histology and Cytology Products; Gibbstown, NY, USA
Sucrose	Ultra Centrifugation Grade, Fisher BioReagents	Fisher Scientific Chemical Division; Fair Lawn, NJ, USA
Kryostat Kalium-Ferrocyanid II	Leica CM3050 S	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Deutschland Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Salzsäure		J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Neutralrot X-Tra-Solv® Ultra Kitt®		FD Neuro Technologies; Baltimore, MD, USA Medite Medizintechnik; Burgdorf, Deutschland J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Axioplan2 Imaging Neurolucida anti-A β Antikörper	6G1 und 8F5	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, Deutschland MicroBrightField, Inc.; Williston, VT, USA Abbott Biocenter; Worcester, MA, USA

6.1.3. Langzeitstudie zur Entwicklung von Mikroblutungen mit/ohne Behandlung

Geräte/Materialien	Bezeichnung	Hersteller/Firma
Mäuse (APP/Lo) Käfige	B6,FVB/N - Tg(APP/V717I) Ventilated Racks, 6x11x6 inches	Taconic Farms, Inc.; Germantown, NY, USA Alternative Design – Lab Animal Housing Solutions™; Siloam Springs, AR, USA
Futter Nestlets Ketamin Medetomidin	Harlan Global Diet 20018Sx NES3600 Ketaset Dormitor	Harlan Teklad; Madison, WI, USA Ancare Corporation; Bellmore, NY, USA Fort Dodge Animal Health; Fort Dodge, IA, USA Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
Antidot®	Antisedan (Medetomidin Reversing-Agent)	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
MRT	Bruker Spectrometer	Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland
Paravision-Konsole Kopfhalter Halter für kleine Nagetiere	Animal Holder (Head Holder) Animal Holder (Holder for small rodents)	Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland InsightMRI; Worcester, MA, USA InsightMRI; Worcester, MA, USA
Empfangsspule Sendespule Peristaltikpumpe PBS neutralgepuffertes Formalin	3.2 cm x 3.6 cm 110 mm Masterflex L/STM GIBCO 10010 10 %	InsightMRI; Worcester, MA, USA InsightMRI; Worcester, MA, USA Cole-Parmer Instrument Co.; Vernon Hills, IL, USA Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, USA Harleco* Histology and Cytology Products; Gibbstown, NY, USA
Sucrose	Ultra Centrifugation Grade, Fisher BioReagents	Fisher Scientific Chemical Division; Fair Lawn, NJ, USA
Kryostat Kalium-Ferrocyanid II	Leica CM3050 S	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Deutschland Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Salzsäure		J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Neutralrot X-Tra-Solv® Ultra Kitt®		FD Neuro Technologies; Baltimore, MD, USA Medite Medizintechnik; Burgdorf, Deutschland J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Axioplan2 Imaging Neurolucida anti-A β Antikörper	6G1	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, Deutschland MicroBrightField, Inc.; Williston, VT, USA Abbott Biocenter; Worcester, MA, USA

6.1.4. Ergänzende Untersuchung von histologischen Markern

Geräte/Materialien	Bezeichnung	Hersteller/Firma
automatisches Färbesystem	Discovery®	Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA
6G1-Antikörper	Maus monoklonal	Abbott Biocenter; Worcester, MA, USA
Cell-Conditionierer2		Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA
Esel Anti-Maus-Antikörper	biotinyliert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc; West Grove, PA, USA
DAB MAPTM Kit		Ventana Medical Systems; Tucson, AZ, USA
Congo Red Kit		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Kresylviolet-Lösung		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Natriumacetat-Puffer		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Silbernitrat		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Pyrogallolsäure		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Natriumthiosulfat		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
X-Tra-Solv®		Medite Medizintechnik; Burgdorf, Deutschland
Ultra Kitt®		J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Axioplan2 Imaging		Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, Deutschland
NeuroLucida		MicroBrightField, Inc.; Williston, VT, USA
MiraxScan		Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Deutschland

6.1.5. Nachweis von Plaque in lebenden Tieren mittels FSB

Geräte/Materialien	Bezeichnung	Hersteller/Firma
Mäuse (Tg2576)	Tg2576 [B6;SJL-Tg (APP/SWE2576Kha)]	Taconic Farms, Inc.; Germantown, NY, USA
Käfige	Ventilated Racks, 6x11x6 inches	Alternative Design – Lab Animal Housing SolutionsTM; Siloam Springs, AR, USA
Futter	Harlan Global Diet 20018Sx	Harlan Teklad; Madison, WI, USA
Nestlets	NES3600	Ancare Corporation; Bellmore, NY, USA
Ketamin	Ketaset	Fort Dodge Animal Health; Fort Dodge, IA, USA
Medetomidin	Dormitor	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
MRT	Bruker Spectrometer	Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland
Paravision-Konsole		Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland
Kopfhalter	Animal Holder (Head Holder)	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Halter für kleine Nagetiere	Animal Holder (Holder for small rodents)	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Empfangsspule	3.2 cm x 3.6 cm	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Sendespule	110 mm	InsightMRI; Worcester, MA, USA
Bruker Fluoreszenzspule		Bruker BioSpin MRI GmbH; Ettlingen, Deutschland
Peristaltikpumpe	Masterflex L/STM	Cole-Parmer Instrument Co.; Vernon Hills, IL, USA
PBS	GIBCO 10010	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, USA
neutralgepuffertes Formalin	10 %	Harleco* Histology and Cytology Products; Gibbstown, NY, USA
Sucrose	Ultra Centrifugation Grade, Fisher BioReagents	Fisher Scientific Chemical Division; Fair Lawn, NJ, USA
Kryostat	Leica CM3050 S	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Deutschland
Agarose		Fisher Scientific Chemical Division; Fair Lawn, NJ, USA
Ethanol		J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Lithiumchlorid		Fisher Scientific Chemical Division; Fair Lawn, NJ, USA
DMSO		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland

Congo Red Kit		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
X-Tra-Solv® Ultra Kitt®		Medite Medizintechnik; Burgdorf, Deutschland J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Axioplan2 Imaging NeuroLucida FSB	(E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxy-carbonyl-4-hydroxy)stryrylbenzen	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, Deutschland MicroBrightField, Inc.; Williston, VT, USA Synthetisiert von Abbott Biocenter; Worcester, MA, USA

6.1.6. PET-Untersuchungen

Geräte/Materialien	Bezeichnung	Hersteller/Firma
Mäuse (Tg2576)	Tg2576 [B6;SJL-Tg (APP/SWE2576Kha)]	Taconic Farms, Inc.; Germantown, NY, USA
Käfige	Ventilated Racks, 6x11x6 inches	Alternative Design - Lab Animal Housing SolutionsTM; Siloam Springs, AR, USA
Futter	Harlan Global Diet 20018Sx	Harlan Teklad; Madison, WI, USA
Nestlets	NES3600	Ancare Corporation; Bellmore, NY, USA
Ketamin	Ketaset	Fort Dodge Animal Health; Fort Dodge, IA, USA
Medetomidin	Dormitor	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
Antidot®	Antisedan®	Orion Corporation; Espoo, Finnland und Pfizer Animal Health; Exton, PA, USA
mikroPET-CT	Siemens Inveon Multimodality-System	Siemens Medical Solutions Inc.; Malverne, PA, USA
Cobra Software	Version: V6.x	Exximm Computing Corporation; Pleasantown, CA, USA
¹⁸ FDG (2-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose)		IBA Molecular North America, Inc.; Ashburn, VA, USA
¹⁴ C-2 -Deoxy-D-Glukose		Perkin Elmer Life & Analytic Sciences; Waltham, MA, USA
Peristaltikpumpe	Masterflex L/STM	Cole-Parmer Instrument Co.; Vernon Hills, IL, USA
PBS neutralgepuffertes Formalin	GIBCO 10010 10 %	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, USA Harleco* Histology and Cytology Products; Gibbstown, NY, USA
Sucrose	Ultra Centrifugation Grade, Fisher BioReagents	Fisher Scientific Chemical Division; Fair Lawn, NJ, USA
Kryostat	Leica CM3050 S	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Deutschland
BioMax MR Film Hyperprocessor		Eastman Kodak Company; Rochester, NY, USA Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, UK
Kamera Kresylviolet-Lösung	QICAM-Fast 1394	Qimaging; Burnaby, Kanada Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Natriumacetat-Puffer		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
DAB		Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; Seelze, Deutschland
Cytochrom-Oxidase C	aus Rinderherz	Fluka Analytica (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH); Seelze, Deutschland
X-Tra-Solv® Ultra Kitt®		Medite Medizintechnik; Burgdorf, Deutschland J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V.; Deventer, Niederlande
Axioplan2 Imaging NeuroLucida Immunglobulin G 2a A-88775-Antikörper	Maus monoklonal	Carl Zeiss Mikroskopie; Jena, Deutschland MicroBrightField, Inc.; Williston, VT, USA Abbott Biocenter; Worcester, MA, USA Abbott Biocenter; Worcester, MA, USA

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe für Neuroanatomie der Firma Abbott GmbH & Co. KG Ludwigshafen und in der Arbeitsgruppe Experimental Imaging, Advanced Technology (Global Pharmaceutical Research and Development), Abbott Park Chicago (Illinois, USA) angefertigt.

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfen verwendet habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder an einem anderen Fachbereich eingereicht. Ferner erkläre ich, dass die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder einer anderen Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Heidelberg, den 12.05.2009

Beate Rösner

Lebenslauf

Beate Rösner

geboren am 21.04.1972 in Köthen

Studium

12/2006 - heute

Abbott GmbH & Co. KG Ludwigshafen und Abbott Park Chicago:
Promotion

Präklinische Forschung; Thema: „Tomographieverfahren bei kleinen Nagern als ein prädiktives Modell zur Darstellung pathologischer Marker bei Morbus Alzheimer“

01/2006 - 10/2006

Abbott GmbH & Co. KG Ludwigshafen: Diplomarbeit

Verhaltenspharmakologie und Rezeptorautoradiographie; Thema: „Pharmakologische Beeinflussung der Kokainsensibilisierung - Auswirkungen auf das dopaminerge System im Gehirn der Ratte“

10/2001 - 11/2006

Leibniz Universität Hannover: Studium der Biologie

Schwerpunkte im Hauptstudium

- Zell- und Entwicklungsbiologie
- Neurobiologie
- Pharmakologie und Toxikologie

Berufliche Tätigkeit

11/1991 - 01/2002

Agnes-Karll-Krankenhaus Laatzen: Tätigkeit als MTA

Labortätigkeiten (Klinische Chemie, Hämatologie und Serologie)

Ausbildung und Schulzeit

09/1998 - 06/2001

Abendgymnasium Hannover: Abitur

09/1988 - 08/1991

Medizinische Fachschule der Martin Luther Universität Halle:
Ausbildung zur Medizinisch-Technischen Laborassistentin

09/1978 - 08/1988

Polytechnische Oberschule Köthen: Erweiterter
Sekundarschulabschluss

Publikationen

Kongressbeiträge

Roesner B, Luo F, Fox GB, Ebert U (2008)

In vivo detected thalamic deposits in APP transgenic mice are calcifications, not amyloid plaques.
ICAD Meeting Chicago (Poster Presentation)

Luo F, Seifert T, Roesner B, Hillen H, Cox BF, Ebert U, Fox GB (2008)

MRI detection and time course of cerebral microhemorrhages during A β antibody treatment in living APP transgenic mice.

ICAD Meeting Chicago (Poster and Oral Presentation) und Neuroscience Meeting Washington (Poster Presentation)

Publikationen in Vorbereitung

Roesner B, Luo F, Fox GB, Ebert U (2008)

In vivo detected thalamic deposits in APP transgenic mice are calcifications, not amyloid plaques.
Geplant für: Neurobiology of Aging

Luo F, Seifert T, Roesner B, Hillen H, Cox BF, Ebert U, Fox GB (2008)

MRI detection and time course of cerebral microhemorrhages during A β antibody treatment in living APP transgenic mice.

Alzheimer's & Dementia: 4; 75

Danksagungen

Herrn Professor Dr. Ulrich Ebert gilt mein größter Dank für die Überlassung des Themas, die Anleitung zur experimentellen neurowissenschaftlichen Forschung, die Unterstützung bei der Abfassung dieser Arbeit und für Einblicke in die Welt von Morbus Alzheimer.

Außerdem bedanke ich mich bei Dr. Gerard B. Fox, Dr. Feng Luo und Dr. Yumin Zhang für die Ermöglichung dieser Arbeit an den Tomographen in Abbott Park (Chicago, USA) und die kompetente Betreuung der Durchführung von Experimenten.

Ich möchte mich bei PD Frau Dr. Manuela Gernert bedanken für ihre Bereitschaft meine Dissertation durch die Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover extern zu betreuen.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Firma Abbott GmbH & Co. KG Ludwigshafen für die Gelegenheit zur Anfertigung dieser Dissertation. Mein Dank für eine freundliche und kooperative Atmosphäre gilt außerdem den einzelnen Mitarbeitern in beiden Arbeitsgruppen in denen ich tätig war: Neuroanatomie (Ludwigshafen) und Experimental Imaging (Chicago), insbesondere Agathe Stanek, Bodo Janson, Brigitte Theobald, Christine Schuster, Jitka Junge-Löcken und Terese R. Seifert.

Ferner möchte ich mich bei Claudia Perez-Cruz, Corinna Klein und Marc Nolte für die wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Diskussionen bedanken.