Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie (Prof. Dr. S. O. Rizzoli, Ph.D.) im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# Nanoskalauntersuchungen vom zellulären Metabolismus mittels Sekundärionen-Massenspektrometrie

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

für Zahnmedizin

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lena Karsten

aus

Berlin

Göttingen 2022

| Dekan: | Prof. Dr. med. W. Brück |
|--------|-------------------------|
|        |                         |

# Betreuungsausschuss

| Betreuer:    | Prof. Dr. S. O. Rizzoli, Ph.D. |
|--------------|--------------------------------|
| Ko-Betreuer: | Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub  |

# Prüfungskommission

| Referent/in       | Prof. Dr. S. O. Rizzoli, Ph.D.  |
|-------------------|---------------------------------|
| Ko-Referent/in:   | Prof. Dr. Henning Urlaub        |
| Drittreferent/in: | PD Dr. Sabine Sennhenn-Kirchner |

Datum der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Nanoskalauntersuchungen vom zellulären Metabolismus mittels Sekundärionen-Massenspektrometrie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

# Inhaltsverzeichnis

| Abbildungsverzeichnis III |                                                                                                                              |             |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Abkü                      | irzungsverzeichnis                                                                                                           | V           |
| 1                         | Einleitung                                                                                                                   | 1           |
| 1.1                       | Die Alzheimerkrankheit                                                                                                       | 1           |
| 1.1.1                     | Symptome und Krankheitsverlauf                                                                                               | 2           |
| 1.1.2                     | Klassifikation der Alzheimerkrankheit                                                                                        | 3           |
| 1.1.3                     | Physiologie und Pathophysiologie vom Amyloid-Präkursor- und Tau-Protein                                                      | 5           |
| 1.2                       | Theorien zur Bildung von Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen                                                                   | 10          |
| 1.2.1                     | Amyloidkaskadentheorie und ihre Modifikationen                                                                               | 10          |
| 1.2.2                     | Entstehung von Oligomeren und Amyloidfibrillen                                                                               | 11          |
| 1.2.3                     | Aufbau und Eigenschaften der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen                                                               | 14          |
| 1.2.4                     | Metabolismus der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen                                                                           | 15          |
| 1.3                       | Ziel der Arbeit                                                                                                              |             |
| 2                         | Material und Methoden                                                                                                        | 20          |
| 2.1                       | Herstellung der Präparate aus transgenen Mäusen                                                                              | 20          |
| 2.2                       | Entstehung der zu untersuchenden Bilder aus den Präparaten                                                                   | 21          |
| 2.2.1                     | Fluoreszenzbilder                                                                                                            | 21          |
| 2.2.2                     | NanoSIMS-Bilder                                                                                                              | 22          |
| 2.3                       | Bildbearbeitung mit MATLAB, Image J, Photoshop                                                                               | 24          |
| 2.3.1                     | Pixel-Binning und Anpassung der Bit-Tiefe mit MATLAB                                                                         | 24          |
| 2.3.2                     | Zuordnung der Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder mit Image J                                                                   | 25          |
| 2.3.3                     | Bildbearbeitung und -verschneiden der Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder mit<br>Photoshop CS6                                  | Adobe<br>26 |
| 2.4                       | Bildanalyse                                                                                                                  | 27          |
| 2.4.1                     | Untersuchung der ROIs durch Bestimmung der Isotopenverhältnisse                                                              |             |
| 2.4.2                     | Untersuchung der ROIs mithilfe von Linescans                                                                                 |             |
| 2.4.3                     | Statistische Analysen                                                                                                        |             |
| 3                         | Ergebnisse                                                                                                                   |             |
| 3.1                       | Transgene Mäuselinien für die Erforschung der Pathologien                                                                    |             |
| 3.1.1                     | 5xFAD-Mäuselinie                                                                                                             |             |
| 3.1.2                     | Tau-P301L-Mäuselinie                                                                                                         |             |
| 3.2                       | Untersuchung der ROIs mithilfe verschiedener Isotopenverhältnisse in der 5<br>Mäuselinie                                     | xFAD-<br>36 |
| 3.2.1                     | Untersuchung der Proteindynamik mit <sup>13</sup> C <sup>14</sup> N/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N in der 5xFAD-Mäuselinie |             |

| 6     | Literaturverzeichnis                                                                                                               |  |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 5     | Zusammenfassung62                                                                                                                  |  |
| 4.5   | Schlussfolgerung                                                                                                                   |  |
| 4.4   | Limitationen der Arbeit                                                                                                            |  |
| 4.3   | Relevanz der Ergebnisse für den Menschen                                                                                           |  |
| 4.2   | Phosphoreinbau in Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen                                                                                |  |
| 4.1   | Metastabile Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen                                                                                      |  |
| 4     | Diskussion 51                                                                                                                      |  |
| 3.5   | Untersuchung der Proteindynamik mit Linescans vom Zentrum des Signals bis zur<br>Peripherie in der Tau-P301L-Mäuselinie            |  |
| 3.4   | Untersuchung der Proteindynamik mit Linescans vom Zentrum des Signals bis zur<br>Peripherie in der 5xFAD-Mäuselinie                |  |
| 3.3.3 | Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup> P/ <sup>32</sup> S in der Tau-P301L-Mäuselinie4                         |  |
| 3.3.2 | Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup> P/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N in der Tau-P301L-Mäuselinie 42       |  |
| 3.3.1 | Untersuchung der Proteindynamik mit <sup>13</sup> C <sup>14</sup> N/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N in der Tau-P301L-Mäuselinie41 |  |
| 3.3   | Untersuchung der ROIs mithilfe verschiedener Isotopenverhältnisse in der Tau-P301L-<br>Mäuselinie                                  |  |
| 3.2.3 | Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup> P/ <sup>32</sup> S in der 5xFAD-Mäuselinie                              |  |
| 3.2.2 | Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup> P/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N in der 5xFAD-Mäuselinie38            |  |

# Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 1: Schematische Darstellung der amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Spaltung von<br>APP                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abbildung 2: Die sechs Isoformen von Protein Tau 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R und 2N4R                                                                                 |
| Abbildung 3: Darstellung der nukleationsabhängigen Amyloid-Aggregation                                                                                                 |
| Abbildung 4: Morphologische Unterschiede der Aβ-Plaques14                                                                                                              |
| Abbildung 5: Korrelationen der Plaquegröße in Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs und in<br>Abhängigkeit des Alters bei Symptombeginn16                                |
| Abbildung 6: Vergleich der Plaquegrößenverteilung zwischen Alzheimer- und Nicht-<br>Alzheimererkrankten                                                                |
| Abbildung 7: Aufbau NanoSIMS19                                                                                                                                         |
| Abbildung 8: Fluoreszenzbilder mit Autofluoreszenz (Kanal C = 0) und mit spezifischer<br>Antikörperfärbung (Kanal C = 1)                                               |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung der NanoSIMS-Technik                                                                                                             |
| Abbildung 10: Binning der NanoSIMS-Bilder mit MATLAB25                                                                                                                 |
| Abbildung 11: Zuordnung der Bilder mit Image J und horizontale Drehung der Fluoreszenzbilder26                                                                         |
| Abbildung 12: Bildbearbeitung und -verschneiden der Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder mit<br>Adobe Photoshop CS627                                                      |
| Abbildung 13: Einteilung der vier Bereiche durch Signale in den Fluoreszenzbildern                                                                                     |
| Abbildung 14: Linescans in den drei definierten Bereichen                                                                                                              |
| Abbildung 15: Schema 5xFAD-Transgene mit Thy-1-APP und Thy-1-PSEN-1                                                                                                    |
| Abbildung 16: Schema Tau-P301L-Transgen mit Thy-1-Tau                                                                                                                  |
| Abbildung 17: 5xFAD-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>13</sup> C <sup>14</sup> N/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N von drei definierten Bereichen       |
| Abbildung 18: 5xFAD-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup> P/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N von drei definierten Bereichen                       |
| Abbildung 19: 5xFAD-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup> P/ <sup>32</sup> S von drei definierten<br>Bereichen                                    |
| Abbildung 20: Tau-P301L-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>13</sup> C <sup>14</sup> N/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N von drei definierten Bereichen41 |
| Abbildung 21: Tau-P301L-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup> P/ <sup>12</sup> C <sup>14</sup> N von drei definierten Bereichen                   |
| Abbildung 22: Tau-P301L-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup> P/ <sup>32</sup> S von drei definierten Bereichen                                   |
| Abbildung 23: Linescans der 5xFAD-Mäuselinie einzeln dargestellt45                                                                                                     |
| Abbildung 24: Linescans 5xFAD-Mäuselinie46                                                                                                                             |
| Abbildung 25: Linescans der Tau-P301L-Mäuselinie einzeln dargestellt                                                                                                   |

| Abbildung 26: Linescans Tau-P301L-Mäuselinie                                        | .50 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 27: Plaquewachstum von 6 Monate alten und 10 Monate alten Mäusen in Tagen | .52 |
| Abbildung 28: Dynamik der Plaqueformation in Abhängigkeit von der Zeit mit NanoSIMS | .54 |

# Abkürzungsverzeichnis

| AICD       | intrazelluläre Domäne von APP (APP intracellular domain)            |
|------------|---------------------------------------------------------------------|
| Alzheimer  | Alzheimerkrankheit                                                  |
| ApoE4      | Apolipoprotein E4                                                   |
| APP        | Amyloid-Präkursor-Protein                                           |
| BACE-1     | β-Sekretase (β-Site of APP cleaving enzyme)                         |
| BW         | Bandbreite (bandwidth)                                              |
| CCD        | ladungsgekoppelte Vorrichtung (charge coupled device)               |
| C-Terminus | Carboxyl-Terminus                                                   |
| CWL        | Zentralwellenlänge (central wavelength)                             |
| DAlzG      | Deutsche Alzheimer Gesellschaft                                     |
| DGN        | Deutsche Gesellschaft für Neurologie                                |
| DGPPN      | Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie,           |
|            | Psychosomatik und Nervenheilkunde                                   |
| DZNE       | Deutsches Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen                |
| EEG        | Elektroenzephalogramm                                               |
| FAD        | familiäre Alzheimerkrankheit (familial Alzheimer's Disease)         |
| IOW        | Leibniz Institut für Ostseeforschung in Warnemünde                  |
| LCP        | konjugierte Polyelektrolyt-Sonde (luminescent conjugated po-        |
|            | lyelectrolyte probe)                                                |
| MAPT       | mikrotubuliassoziiertes Tau-Protein (microtubule associated protein |
|            | tau)                                                                |
| MRT        | Magnetresonanztomographie                                           |
| NanoSIMS   | Nanoskala-Sekundärionen-Massenspektrometrie                         |
| NFT        | Neurofibrillen (neurofibrillary tangles)                            |
| N-Terminus | Amino-Terminus                                                      |
| PET        | Positronen-Emissions-Tomographie                                    |
| PSEN-1     | Präsenilin-1                                                        |
| PSEN-2     | Präsenilin-2                                                        |
| ROI        | region of interest                                                  |
| SILK       | Inkorporation von stabilen Isotopen (stable isotope labelling ki-   |
|            | netics)                                                             |

# 1 Einleitung

### 1.1 Die Alzheimerkrankheit

Die Alzheimerkrankheit, kurz Alzheimer, ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit (Bertram und Tanzi 2008). Sie weist oftmals einen langsam progredienten, aber bisher unheilbaren Krankheitsverlauf auf (DGN und DGPPN 2016). Pathophysiologisch zeichnet sich die Alzheimerkrankheit durch die Akkumulation und Aggregation der Proteine A $\beta$  und Tau aus. Die Aggregate, die als A $\beta$ -Plaques bzw. Tau-Neurofibrillen erstmals vom deutschen Neurologen Alois Alzheimer beschrieben wurden, besitzen die Fähigkeit, sich in verschiedene Gehirnareale auszubreiten (Tiwari et al. 2019). Der Beginn der Ausbreitung wird sowohl in bestimmten Strukturen wie dem limbischen System und den subkortikalen Nuklei als auch als direktes Resultat einer synaptischen Dysfunktion diskutiert (Braak und Del Tredici 2011; Selkoe 2002; Hyman et al. 1984). Neben der Ausbildung der A $\beta$ -Plaques und Tau-Neurofibrillen zeigen sich die für neurodegenerative Erkrankungen typischen pathologischen Veränderungen der Nervenzellen, die in einem Funktionsverlust und/oder Abbau der Nervenzellen resultieren. Im Jahr 2020 waren weltweit ungefähr 55 Millionen und in Deutschland circa 1,5 Millionen Menschen von einer Demenz betroffen, von denen 50 – 70% auf die Alzheimerkrankheit zurückzuführen waren (DGN und DGPPN 2016; World Alzheimer Report 2015; DAlzG 2020).

Alzheimer ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren Ätiologie noch nicht vollständig geklärt ist. Die Inzidenz ist altersabhängig (DGN und DGPPN 2016). Ein Neuntel der über 65-Jährigen sind von Alzheimer betroffen, wohingegen im Alter von 85 Jahren bereits jeder Dritte erkrankt ist (Herrup 2015). Insgesamt sind zwei Drittel aller Betroffenen über 85 Jahre alt (DAlzG 2020). Zusätzlich zeigt sich ein altersbedingter Rückgang des Proteostasenetzwerks (Hartl 2017). Das Proteostasenetzwerk kontrolliert unter anderem die Proteinfaltung, den Proteinabbau und die Proteinkonzentrationen (Balch et al. 2008). Dementsprechend wird die Akkumulation und Aggregation von Proteinen bei einer Reduktion der Proteostase erleichtert (Massey et al. 2006). An der Aufrechterhaltung der Proteostase sind viele Regulatoren beteiligt. Hierzu gehören beispielsweise die Chaperone, die endoplasmatische Retikulum assoziierte Degradation sowie die Autophagie (Parzych und Klionsky 2014; Brehme et al. 2014; Adnan et al. 2016). Im Alter sinkt die ATP-abhängige Chaperonexpression um 32% (Brehme et al. 2014). Das Proteostasenetzwerk kann jedoch auch altersunabhängig durch vererbte Mutationen gestört werden (Balch et al. 2008). Neben dem steigenden Alter und/oder dem Rückgang des Proteostasenetzwerks kann die Entstehung von Alzheimer durch Mutationen, Umweltfaktoren, Lebensstil und Vorerkrankungen begünstigt werden (Tiwari et al. 2019; Chiti und Dobson 2017; Baumgart et al. 2015).

#### 1.1.1 Symptome und Krankheitsverlauf

Die Symptomatik von Alzheimer beginnt in den meisten Fällen schleichend und zeigt einen progredienten Verlauf über mehrere Jahre (DGN und DGPPN 2016). Durchschnittlich zeigt sich bei Alzheimer mit langsam progredientem Verlauf eine Überlebensrate von zehn Jahren nach Symptombeginn (Cohen et al. 2016). Alzheimerpatient:innen weisen eine klinische und pathologische Heterogenität auf, wodurch die Diagnosestellung erschwert wird (Twohig und Nielsen 2019). Erste Anzeichen für eine Erkrankung sind oftmals Wortfindungsstörungen und Probleme mit dem Kurzeitgedächtnis. Im Verlauf der Krankheit zeigen sich zunehmend Beeinträchtigungen in zeitlicher und örtlicher Orientierung, in Alltagskompetenzen sowie in der Kommunikation. Außerdem treten im fortgeschrittenen Stadium Verhaltensauffälligkeiten wie Apathie und DGPPN 2016; Cohen et al. 2016).

Neben der subjektiven Beschreibung der Symptome werden objektive Tests für die Diagnostik von Alzheimer durchgeführt. Dazu gehören kognitive Kurztests, Gentests, Liquoruntersuchungen, das Elektroenzephalogramm (EEG) und bildgebende Verfahren wie der Magnetresonanztomographie (MRT) sowie der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (DGN und DGPPN 2016). Die Gentests zeigen, ob autosomal-dominante Mutationen in den Genen des Amyloid-Präkursor-Proteins (*APP*), Präsenilin-1 (*PSEN-1*) und Präsenilin-2 (*PSEN-2*) vorhanden sind oder ob Apolipoprotein E4 (ApoE4)-Allele vorliegen, die mit einer Alzheimerkrankheit assoziiert werden (Bekris et al. 2010). Diagnostische Marker für eine Alzheimerkrankheit können ein positiver Amyloid-Nachweis im PET beziehungsweise eine erniedrigte Aβ-42-Konzentrationen im Liquor sein (DGN und DGPPN 2016; McKhann et al. 2011). Als Marker für eine neuronale Störung gelten erhöhte Konzentrationen des Tau-Proteins bzw. des phosphorylierten Tau-Proteins im Liquor (DGN und DGPPN 2016). Weitere Anzeichen können eine Atrophie des medialen Temporallappens im MRT und eine Verlangsamung des EEGs sein (DGN und DGPPN 2016). Mit kognitiven Tests kann eine Abstufung in leichte, moderate und schwere Alzheimer vorgenommen werden (DGN und DGPPN 2016; Trzepacz et al. 2015).

Obwohl bereits seit Jahren die klinische Symptomatik und die neuropathologischen Veränderungen der Alzheimerkrankheit erforscht werden, ist die kausale Ursache der Krankheit bisher nicht bekannt. Daher erfolgt die Therapie trotz zahlreicher Therapieansätze wie zum Beispiel der Reduzierung von Aβ- und Taukonzentrationen oder der Stabilisierung der Zelle durch Förderung des Proteostasenetzwerks bisher rein symptomatisch (Tiwari et al. 2019; Wisniewski und Einleitung

Boutajangout 2010; Balch et al. 2008). Mithilfe der Schweregradeinteilung kann die medikamentöse Therapie angepasst werden. In Deutschland werden Acetylcholinesterasehemmer bei leichter bis moderater Alzheimer und nicht-kompetitive NMDA-Antagonisten bei moderater bis schwerer Alzheimer gegeben (DGN und DGPPN 2016). Abhängig vom psychischen Zustand der erkrankten Person können zusätzlich Antidepressiva und Neuroleptika verschrieben werden (DGN und DGPPN 2016). Das therapeutische Ziel ist, die Autonomie der erkrankten Person und deren Lebensqualität so lange wie möglich zu erhalten (DGN und DGPPN 2016). Insgesamt weisen Patient:innen eine erhöhte Komorbidität und eine verkürzte Lebenserwartung auf (DGN und DGPPN 2016).

Für den Amyloidnachweis im PET werden Radioliganden eingesetzt, die an A $\beta$  binden sollen (Suppiah et al. 2019). Jedoch können die Liganden nur eine Teilmenge von A $\beta$  halten, sodass nicht die vollständige Amyloidlast gemessen werden kann (Matveev et al. 2014). Außerdem kann eine Amyloid-Positivität auch bei älteren Nicht-Alzheimererkrankten auftreten (Herukka et al. 2017). Noch im 60. Lebensjahr ist ein positiver Nachweis unwahrscheinlich, im Alter von 85 Jahren zeigt sich bei Nicht-Alzheimererkrankten hingegen eine über 50%ige Wahrscheinlichkeit für eine Amyloidlast (Jack et al. 2014). Ob der A $\beta$ -Nachweis als ein Prodromalstadium von Alzheimer oder als eine physiologische Alterserscheinung einzuschätzen ist, wird diskutiert (Suppiah et al. 2019; Twohig und Nielsen 2019).

#### 1.1.2 Klassifikation der Alzheimerkrankheit

Die Alzheimerkrankheit kann in eine sporadische und eine familiäre Form unterschieden werden. Die sporadische Alzheimerkrankheit lässt sich wiederum in einen langsam progredienten bzw. schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf mit spätem bzw. frühem Beginn aufgliedern. Die familiäre Form wird durch autosomal-dominante Mutationen ausgelöst.

Die sporadische Alzheimer umfasst die Alzheimererkrankten, denen keine direkte Ursache zugrunde liegt (Twohig und Nielsen 2019). Zwei Drittel der Erkrankten sind weiblich. Dies wird als Folge der höheren Lebenserwartung von Frauen angesehen (Cohen et al. 2016). 90% aller sporadischen Alzheimererkrankungen zeigen einen späten Beginn ab dem 65. Lebensjahr, der durch einen oftmals langsam progredienten Krankheitsverlauf charakterisiert ist (DGN und DGPPN 2016; Twohig und Nielsen 2019). Nach der Diagnosestellung wird eine Lebenserwartung von durchschnittlich zehn Jahren angenommen (Cohen et al. 2016). Hauptrisikofaktoren sind steigendes Alter und höhere ApoE4-Konzentrationen (Alzheimer's association 2018). Mit steigendem Alter zeigen sich unter anderem mehr inflammatorische Prozesse, erworbene Mutationen und Defizite der Proteinhomoöstase, sodass die Zelle anfälliger gegenüber pathologischen Prozessen wird (Moorad und Promislow 2008; Sparkman und Johnson 2008; Balch et al. Einleitung

2008). Insbesondere bei einem späten Beginn der Krankheit ist die Epigenetik entscheidend (Tiwari et al. 2019). Als wichtigster genetischer Risikofaktor für Alzheimer mit spätem Beginn gilt das Vorhandensein des Apolipoproteins E4 (Yu et al. 2014). ApoE dient der Aufrechterhaltung der Hirnfunktionen durch die Kontrolle der Cholesterinkonzentrationen und repariert die Zellen bei einer Gehirnschädigung (Menta und Swerdlow 2019). Es gibt drei allelische Varianten, von denen Allel 3 mit 78% am häufigsten, Allel 4 mit 15% am zweithäufigsten und Allel 2 mit 7% am seltensten vorkommt (Menta und Swerdlow 2019). ApoE4 beeinflusst die Aggregation von Aβ positiv (Yu et al. 2014). Des Weiteren zeigen sich Wechselwirkungen zwischen ApoE4, Neuroinflammation und Mitochondrienmetabolismus (Menta und Swerdlow 2019). Ungefähr 15% aller Menschen sind heterozygote Träger, die eine Kopie des Allels besitzen und ein zwei- bis dreifach höheres Risiko für Alzheimer haben. Homozygote Träger mit zwei Kopien des Gens, die 2% der Gesamtbevölkerung ausmachen, zeigen ein acht- bis zehnfach höheres Risiko zu erkranken (DGN und DGPPN 2016; Lee und Han 2013).

Eine andere Form der sporadischen Alzheimererkrankung zeichnet sich durch einen frühen Beginn aus. Ungefähr 10% aller Erkrankten weisen einen frühen Beginn der Symptomatik zwischen dem 45. und 65. Lebensjahr auf (Cohen et al. 2016; DGN und DGPPN 2016). Diese Alzheimerform zeigt häufiger einen schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf mit deutlichen und mannigfaltigen Störungen der höheren kortikalen Funktionen als die Alzheimer mit spätem Beginn (DGN und DGPPN 2016). Bei der schnell progredienten Form wird eine Überlebensrate von unter drei Jahren angenommen, wobei das durchschnittliche Überleben nach der Diagnose bei sieben bis zehn Monaten liegt (Drummond et al. 2017). Außerdem zeigen sich bei der schnell voranschreitenden Erkrankung eine große Heterogenität in der Aß-Konformation und mehr proinflammatorische Zytokine (Drummond et al. 2017; Cohen et al. 2015). In der Literatur werden sowohl eine geringere Häufigkeit des ApoE4-Allels als auch mehr homozygote Allelträger beschrieben (Drummond et al. 2017; Wattmo und Wallin 2017). Den Beginn der Krankheit ausgenommen lassen sich bei beiden Formen der sporadischen Alzheimer keine Unterschiede in Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie feststellen (DGN und DGPPN 2016). Die Morphologie und Lokalisation der Plaques scheinen bei beiden Formen ähnlich zu sein (Drummond et al. 2017). Die Plaquezusammensetzung zeigt jedoch Unterschiede (Drummond et al. 2017). Plaques der schnell progredienten Alzheimer beinhalten eher neuronale Proteine, die langsam progrediente Form hingegen zeigt einen höheren Anteil an Astrozytenproteinen in ihren Plaques (Drummond et al. 2017).

Die familiäre Alzheimerkrankheit (FAD) weist eine andere Pathophysiologie auf (DGN und DGPPN 2016). Als Ursache gelten die autosomal-dominant vererbten Missense-Mutationen in den Genen *APP*, *PSEN-1* und *PSEN-2* (Wisniewski und Boutajangout 2010; DGN und

DGPPN 2016). Bisher sind nur Erkrankungen bekannt, die durch eine einzige Mutation ausgelöst werden (Bekris et al. 2010). Eine Ausnahme bildet hierbei die schwedische Doppelmutation im APP-Gen (Bekris et al. 2010). Maximal 4% aller Erkrankungen werden auf FAD zurückgeführt (Wisniewski und Boutajangout 2010; Bekris et al. 2010). Aufgrund der Mutationen weisen Betroffene oftmals einen frühen Beginn der Alzheimerkrankheit auf (DGN und DGPPN 2016). Es sind bisher 51 pathogene Mutationen im APP-Gen, 219 Mutationen im PSEN-1-Gen und 16 Mutationen im PSEN-2-Gen bekannt (Esquerda-Canals et al. 2017). Mutationen im APP-Gen, welches im Chromosom 21 lokalisiert ist, können abhängig von ihrer Lokalisation die Plaquebildung bestimmen. Mutationen am Amino (N)-Terminus führen zu einer erhöhten Aß-Produktion, wohingegen Mutationen nahe dem Carboxyl (C)-Terminus eher zu einem gesteigerten Verhältnis von A $\beta$ -42 zu A $\beta$ -40 führen (Hatami et al. 2017). Mutationen in der A $\beta$ -Region, die sowohl die Menge an Aß als auch das Verhältnis von Aβ-42 zu Aβ-40 erhöhen, zeigen ein stärkeres Aggregationspotenzial des Proteins (Hatami et al. 2017). PSEN-1 und PSEN-2 sind Bestandteil der y-Sekretase, die für die Spaltung von APP benötigt wird (Edbauer et al. 2003). PSEN-1 ist eine Aspartylprotease und gehört zum katalytischen Teil des Komplexes (Tiwari et al. 2019). PSEN-2, dessen Gen in Chromosom 1 codiert ist, erleichtert die Reifung von PSEN-1 (Tiwari et al. 2019; Bekris et al. 2010). Mutationen in PSEN-2 treten sehr selten auf und scheinen stärker von der Umwelt beeinflusst zu werden als die anderen FAD-Mutationen (Sherrington et al. 1996). 70% aller FAD werden auf eine Mutation im PSEN-1-Gen, welches im Chromosom 14 liegt, zurückgeführt. Die Mutationen führen zu einem frühen bis sehr frühen Beginn von Alzheimer ab 30 Jahren (Bekris et al. 2010). Mutationen in den Präsenilin-Genen reduzieren die Aktivität der y-Sekretase, wodurch die Spaltung von APP modifiziert und Aβ-42 vermehrt gebildet wird und sich somit das Verhältnis zu Aβ-40 erhöht (De Strooper und Annaert 2000; Citron et al. 1997; Walker et al. 2005).

#### 1.1.3 Physiologie und Pathophysiologie vom Amyloid-Präkursor- und Tau-Protein

#### 1.1.3.1 Amyloid-Präkursor-Protein

Das Amyloid-Präkursor-Protein (APP) ist ein integrales Typ-1-Transmembranprotein mit größeren extrazellulären und kleinen intrazellulären Domänen (De Strooper und Annaert 2000). Es wird angenommen, dass APP neuroprotektiv wirkt und der neuronalen Entwicklung dient (De Strooper und Annaert 2000; Oh et al. 2009). APP kann auf amyloidogene und nicht-amyloidogene Weise gespalten werden (Abbildung 1). Der nicht-amyloidogene Weg umfasst das Spalten, bei dem die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase aktiv werden (Tiwari et al. 2019). Die extrazelluläre  $\alpha$ -Sekretase spaltet APP in die Proteine APP $\alpha$  und C99 (Tiwari et al. 2019). Die lösliche Ektodomäne APP $\alpha$ , die eine neuroprotektive Wirkung aufweist und die synaptische Plastizität fördert, wird exozytiert (Baratchi et al. 2012). Das Polypeptid C99 wird durch die γ-Sekretase, der intramembranen Aspartylprotease, in das extrazelluläre P3-Peptid und die intrazelluläre APP-Domäne (AICD) gespalten (Tiwari et al. 2019). AICD, welche nur eine kurze Halbwertszeit aufweist, ist möglicherweise an der Übertragung von Signalen zum Nukleus beteiligt und/oder interagiert mit zytosolischen Proteinen (Dries und Yu 2008; Cupers et al. 2001).

Der amyloidogene Weg führt zur Freisetzung von A $\beta$  durch  $\beta$ -Sekretase (BACE-1) und  $\gamma$ -Sekretase (Tiwari et al. 2019). BACE-1, eine membranumfassende Aspartylprotease, ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und spaltet APP, wobei der N-Terminus von Aß gebildet wird (Tiwari et al. 2019). Die Spaltprodukte sind C83 und die lösliche Ektodomäne APPB, welche 15 bis 16 Aminosäuren kürzer als APPa ist. Die y-Sekretase spaltet C83 in AICD und die Aβ-Proteine Aβ-37 bis Aβ-49 (Dries und Yu 2008). Physiologisch spaltet die α-Sekretase mindestens 90% des APPs, die restlichen 10% teilt die β-Sekretase. Anschließend spaltet die γ-Sekretase das C-Terminal (Kametani und Hasegawa 2018). Die Spaltprodukte sind hauptsächlich APPa, C83, P3 und AICD. APPß und Aß werden in geringen Konzentrationen gebildet (Kametani und Hasegawa 2018). Im pathologischen Zustand überwiegt die Spaltung durch die β-Sekretase, wodurch die Aβ-Konzentration steigt. Geringe Aβ-Konzentrationen können durch Proteasen und Mikroglia abgebaut werden (Tabaton und Piccini 2005; Hickman et al. 2008). Ein gestörter Abbau oder eine gesteigerte Produktion von Aß führen hingegen zu Akkumulationen des Proteins (Tabaton und Piccini 2005; Hickman et al. 2008). Die Produktion und Aggregation von Aß wird durch folgende Faktoren positiv beeinflusst: FAD-Mutationen, Phosphorylierung, hohe Cholesterolkonzentration, oxidativen Stress, Östrogenabfall, Ischämie und ApoE4-Allel(e) (Tabaton und Piccini 2005). Abhängig von der AS-Länge zeigen die Aβ-Proteine verschiedene Eigenschaften. Die häufigsten und am meisten erforschten Vertreter sind A $\beta$ -40 und A $\beta$ -42 (Tiwari et al. 2019). Über die anderen A $\beta$ -Proteine ist bisher wenig bekannt. Aβ-38 scheint ebenso wie Aβ-40 frühzeitig Plaques zu bilden (Carlred et al. 2016). Aβ-43 scheint pathogen zu wirken (Saito et al. 2011). Das Protein Aβ-42 kommt zwar seltener als Aβ-40 vor, ist jedoch neurotoxischer und aggregationsanfälliger als Aβ-40 (Tiwari et al. 2019). Beispielsweise können Aβ-42-Akkumulationen den retrograden Lysosomentransport inhibieren, den oxidativen Stress für die Mitochondrien erhöhen und Kalziumkanäle blockieren (Tiwari et al. 2019). A
ß-42 bildet zunächst lösliche toxische Akkumulationen, die später aggregieren (Tabaton und Piccini 2005). Die Akkumulationen von Aß weisen eine morphologische Vielfalt auf (Rasmussen et al. 2017). Wahrscheinlich können APP und Aß endozytiert werden, sodass Aß in multivesikulären Körpern – Bestandteile des Lysosom-Endosom-Systems – akkumulieren und aggregieren kann (Takahashi et al. 2002). Dementsprechend existieren sowohl intra- als

auch extrazelluläre Plaques (Takahashi et al. 2002). Durch Phosphorylierung können das Aggregationspotenzial und die Stabilität der Aggregate erhöht werden (Kumar et al. 2013; Kumar et al. 2011). Studien an Mäusen zeigen, dass phosphoryliertes A $\beta$  zunächst intrazellulär und im fortgeschrittenen Alter auch extrazellulär reichlich vorkommt (Kumar et al. 2013; Rezaei-Ghaleh et al. 2016).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Spaltung von APP. Abbildung entstammt Kumar und Walter (2011) und wurde mit der Creative-Commons-Lizenz CC BY 3.0 publiziert.

#### 1.1.3.2 Tau-Protein

Das Protein Tau wird im mikrotubuliassoziierten Tau-Protein-(*MAPT*)-Gen auf dem Chromosom 17 codiert und kommt in den Neuronen reichlich vor (Neve et al. 1986; Shin et al. 2020). Durch alternatives Spleißen entstehen im ZNS sechs verschiedene Isoformen (Abbildung 2), die durch sich wiederholende Bereiche am C- und N-Terminus unterschieden werden (Mandelkow und Mandelkow 2012; Goedert et al. 1989). Am C-Terminus kann sich – abhängig vom Spleißen des Exons 10 – der Bereich dreimal (3R) oder viermal (4R) in der Mikrotubulibindungsstelle wiederholen (Kametani und Hasegawa 2018). Im adulten menschlichen Gehirn werden die 3R- und 4R-Isoformen gleichermaßen exprimiert (Noble et al. 2013). Die mittlere Region ist prolinreich und der N-Terminus, welcher sich von den Mikrotubuli wegorientiert, kann einen Bereich einmal (N1), zweimal (N2) oder keinmal (N0) besitzen (Mandelkow und Mandelkow 2012; Noble et al. 2013). Tau ist das wichtigste mikrotubuliassoziierte Protein (Shin et al. 2020). Es fördert den Zusammenbau der Mikrotubuli, stabilisiert diese und beteiligt sich

8

am Axontransport (Stamer et al. 2002; Cleveland et al. 1977). Zusätzlich dient es als Projektionsdomäne für andere Proteine, die mit den Mikrotubuli interagieren, stabilisiert die DNA und ist an synaptischen Signalen beteiligt (Drubin und Kirschner 1986; Mandelkow und Mandelkow 2012; Sultan et al. 2011). Während der Reifung befindet sich Tau vornehmlich axonal, im ausgereiften Stadium kommt es physiologisch auch somato-dendritisch und extrazellulär vor (Mandelkow und Mandelkow 2012; Noble et al. 2013). Physiologisch extrazellulär vorkommendes Tau wirkt wahrscheinlich neuroprotektiv (Noble et al. 2013).

Tau besitzt eine hochflexible Polypeptidkette, die nur durch wenig Sekundärstruktur stabilisiert wird (Mandelkow und Mandelkow 2012). Deswegen ist es im nativen Zustand intrinsisch ungeordnet, ungefaltet und hydrophil (Schweers et al. 1994). Das Protein kann viele vorübergehende Interaktionen eingehen und dabei verschiedene strukturelle und biochemische Konformationen annehmen (Mukrasch et al. 2009). Das Protein Tau bindet an zytoskelettalen Proteinen, zu denen unter anderem die Mikrotubuli gehören und an Membranproteinen (Mandelkow und Mandelkow 2012). Die Eigenschaften von Tau werden von posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung beeinflusst (Mandelkow und Mandelkow 2012). Tau besitzt 85 potentielle Phosphorylierungsstellen, von denen die meisten in der prolinreichen Domäne liegen (Noble et al. 2013). Physiologisch ist Tau an zwei bis drei Stellen phosphoryliert (Köpke et al. 1993). Die Bedeutung der Phosphorylierung bei Alzheimer wird kontrovers diskutiert. Einen dephosphorylierten Zustand zeigt Tau bei einer zu starken Erwärmung und bei oxidativem Stress, um die DNA zu schützen (Davis et al. 1997; Mandelkow und Mandelkow 2012). Bei fortgeschrittener Alzheimer zeigt sich hingegen eine vierfach höhere Phosphorylierung, auch wenn in einem frühen Alzheimerstadium keine Hyperphoshorylierung von Tau nachweisbar ist (Köpke et al. 1993; Planel et al. 2007; Yen 2011). Außerdem können eine Anästhesie, das weibliche Geschlecht und altersbedingte Konformationsänderungen der Proteine eine erhöhte Phosphorylierung bedingen (Planel et al. 2007; Terwel et al. 2005; Buccarello et al. 2017). Die Kinasen Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) und Cyclin-abhängige Kinase 5 (CDK5), die beide Tau phosphorylieren, können durch Aß aktiviert werden (Tiwari et al. 2019). Durch eine erhöhte Phosphorylierung erhöhen sich die Tau-Konzentrationen im somato-dendritischen Bereich und die Affinität zu den Mikrotubuli verringert sich, sodass die Mikrotubulistruktur destabilisiert und der Axontransport gestört wird (Noble et al. 2013). Andererseits wird beschrieben, dass eine Phosphorylierung - abhängig von der Phosphorylierungsstelle - entweder aggregationsfördernd oder aggregationshemmend wirken kann (Schneider et al. 1999; Iqbal et al. 2008). Dementsprechend könnte eine Hyperphosphorylierung eher den Zustand der Zelle darstellen, als ein absoluter Marker für Alzheimer zu sein (Mandelkow und Mandelkow 2012). In der Diagnostik von Alzheimer wird erhöhtes phosphoryliertes Tau als Marker für eine neuronale Schädigung genommen (DGN und DGPPN 2016).



Abbildung 2: Die sechs Isoformen von Protein Tau 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R und 2N4R. Abbildung entstammt Noble et al. (2013) und wurde mit der Creative-Commons-Lizenz CC BY 3.0 publiziert.

Ungebundenes Tau besitzt bei einem funktionsfähigem Proteostasesystem eine fünftägige Halbwertszeit (Bandyopadhyay et al. 2007). Wenn sich die Eigenschaften des Proteins verändern und das Proteostasenetzwerk Defizite aufweist, kann Tau akkumulieren (Noble et al. 2013; Yen 2011; Friguet et al. 2000). Die Tau-Akkumulationen können sich zu polymorphen Aggregaten entwickeln, die sich im Gehirn ausbreiten können (Goedert und Spillantini 2017). Es existieren verschiedene Theorien zur Ausbreitung der Tau-Aggregate. Erstens könnte das degenerierte Tau, welches entweder extrazellulär aggregiert ist oder aus einer degenerierten Zelle freigesetzt wurde, durch eine Nachbarzelle aufgenommen werden und dort weitere Aggregate bilden (Frost et al. 2009). Möglicherweise fungiert APP hierbei als Rezeptor für die Aufnahme von Tau in die Zelle (Takahashi et al. 2015). Zweitens könnten die Tauaggregate über anatomisch verbundene Zellen weitergegeben werden oder drittens könnte die Aggregation durch die Aufnahme in Gliazellen beeinflusst werden, da die Gliazellen die Tau-Phosphorylierung fördern (Gorlovoy et al. 2009; Li Liu et al. 2012). Der Mechanismus der Ausbreitung ist noch nicht vollständig geklärt (Goedert und Spillantini 2017). Jedoch scheint die Ausbreitung mit dem kognitiven Zustand und der Neurodegeneration einherzugehen (Bejanin et al. 2017; Okamura und Yanai 2017). Eine Tauopathie tritt außer bei Alzheimer auch in der frontotemporalen Demenz und in der Parkinsonkrankheit auf (Medina und Avila 2014).

#### 1.2.1 Amyloidkaskadentheorie und ihre Modifikationen

Die Bildung der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen sowie die Neurodegeneration sind kennzeichnend für den Krankheitsverlauf von Alzheimer. Anfang der 90er Jahre entstand die Amyloidkaskadentheorie als Versuch die Ursache der Neurodegeneration zu beschreiben. Die Amyloidkaskadentheorie beschreibt anhand eines linearen Krankheitsmodells Aß als die direkte Ursache für die Neurodegeneration (Hardy und Allsop 1991). Ein veränderter APP-Metabolismus - durch Umweltfaktoren, Mutationen und bei der Trisomie 21 durch eine Verdopplung des APP-Gens – führt zu höheren Aβ-Ablagerungen, die Plaques bilden (Hardy und Allsop 1991). Diese Plaques führen direkt zu Zellschäden, einem Abbau von Transmittern und zur Bildung von Tau-Neurofibrillen, die wiederum mit einem Zellverlust einhergehen (Hardy und Allsop 1991). Laut der Amyloidkaskadentheorie ist der Zellverlust die Ursache für die Demenz (Hardy und Allsop 1991). Erweiternde Modifikationen der Theorie beschreiben eine durch Aß ausgelöste neurodegenerative Kaskade, in der Aß direkt und indirekt zum Neuronenverlust führen kann (Hardy und Selkoe 2002; Chiba et al. 2009). Neben dem direkten Zellschaden führt Aβ in einer Kaskade zu erhöhtem oxidativen Stress, Neuroinflammation und Tau-Aggregation (Nikolaev et al. 2009; Herrup 2015). Hardy und Higgins (1992) beschreiben zum Beispiel eine Aß bedingte Störung in der Kalzium-Homöostase, in der erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen die Tau-Aggregation fördern. Die Amyloidkaskadentheorie ist jedoch umstritten (Twohig und Nielsen 2019). Ein Viertel bis ein Drittel aller älteren Menschen besitzen Amyloidablagerungen, die teilweise genauso stark ausgebildet sind wie bei Alzheimererkrankten, jedoch nicht zu kognitiven Beeinträchtigungen führen (Herrup 2015). Außerdem zeigen transgene Mäuselinien mit verschiedenen FAD-Mutationen zwar eine Überexpression von humanem APP aber keine Bildung von Tau-Neurofibrillen und/ oder Neuronenverlust (Castellani et al. 2006; Calhoun et al. 1998; Esquerda-Canals et al. 2017). Teilweise sind keine oder kaum kognitive Einschränkungen bemerkbar (Kim et al. 2013). Andererseits äußert sich die seltene familiäre Alzheimerform beim Menschen oftmals durch einen frühen Krankheitsbeginn (DGN und DGPPN 2016). Demnach scheint Aß entscheidend für den Krankheitsverlauf zu sein (Herrup 2015). Die häufiger vorkommende sporadische Alzheimerform zeigt sich eher als eine komplexe systematische Fehlfunktion des Nervensystems mit multiplen Faktoren (Herrup 2015). Mögliche Faktoren sind das Alter, das Versagen der Zellzykluskontrolle, eine Neuroinflammation und eventuell die verstärkte Ablagerung von APP bei neuronalem Stress (Hardy und Higgins 1992; Herrup 2010, 2015). Es wird von einer neurotoxischen Wirkung der APP-Fragmente AICD, C83, C99 und P3 ausgegangen (Robakis und Georgakopoulos 2014; Kametani und Hasegawa 2018). Insbesondere die Spaltprodukte des C-Terminals führen bei einer Akkumulation zu einer neuronalen Störung (Kametani und Hasegawa 2018). Teilweise wird die Amyloidkaskadentheorie vollständig negiert und durch die Tauhypothese ersetzt. Laut der Tauhypothese ist das Protein Tau, welches sich im Gehirn ausbreiten kann, verantwortlich für die Demenz (Kametani und Hasegawa 2018). Braak und Braak (1991) teilten die Ausbreitung der Tauaggregate in sechs Stadien ein. Demnach beginnt die Ausbreitung in der entorhinalen Region (Stadium 1 und 2), setzt sich in die limbische Region (Stadium 3 und 4) fort und endet in den neokortikalen Arealen (Stadium 5 und 6). Da die Ausbreitung von Tauaggregaten mit dem Ausmaß der Demenz korreliert, wird der progrediente Krankheitsverlauf dementsprechend mit der Taupathologie assoziiert (Kametani und Hasegawa 2018; Bejanin et al. 2017; Okamura und Yanai 2017). Des Weiteren können sich Tau-Akkumulationen bilden, bevor Aβ-Ablagerungen entstehen (Braak und Del Tredici 2011).

#### 1.2.2 Entstehung von Oligomeren und Amyloidfibrillen

Die Proteine Aß und Tau können – wie beispielswiese α-Synuclein in der Parkinsonkrankheit oder das Prion in der Kreutzfeldt-Jakob-Krankheit – unter bestimmten Umständen aggregieren (Chiti und Dobson 2017). Die Aggregation ist ein Prozess, in dem zunächst wenige Moleküle mit unveränderter Struktur akkumulieren und schließlich eine Umstrukturierung zu stabilen β-Faltblattstrukturen stattfindet (Bleiholder et al. 2011; Plakoutsi et al. 2005; Serio et al. 2000). Sowohl Tau- als auch Aß-Aggregate können verschiedene morphologische Formen einnehmen (Rasmussen et al. 2017; Goedert und Spillantini 2017). Proteine sind dafür bekannt, dass sie verschiedene Konformationen abhängig von ihren Bindungspartnern und posttranslationalen Modifikationen einnehmen können (Dobson 2003; Dunker et al. 2008). Ihr nativer Zustand gilt zwar als der thermodynamisch günstigste jedoch nicht als der stabilste Zustand (Hartl 2017). Es werden strukturierte und unstrukturierte Proteine unterschieden. Bei intrinsisch unstrukturierten Proteinen ist einerseits die Ausbildung von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen erschwert, andererseits gelten sie als bindungsfreudige Proteine (Chiti und Dobson 2017; Dunker et al. 2008). Das Protein Tau, das physiologisch unstrukturiert vorkommt, nimmt beispielsweise erst bei einer spezifischen Bindung eine definierte Struktur ein. APP hingegen ist ein gefaltetes Protein, welches einen unstrukturierten Teilabschnitt besitzt, in dem sich die Aminosäuresequenz von Aß befindet. Durch die pathologische Spaltung von APP entsteht somit das intrinsisch unstrukturierte Protein Aß (Chiti und Dobson 2017). Die Konformationsänderungen der Proteine wird durch das Proteostasenetzwerk kontrolliert (Balchin et al. 2016; Balch et al. 2008). Bei einem Proteostaseversagen, einer erhöhten Stabilität des Proteins und/oder einer erhöhten Konzentration wird das physiologische Gleichgewicht gestört (Balchin et al. 2016; Chiti und

12

Dobson 2017; Hardy und Selkoe 2002). Aus den monomeren Proteinen bilden sich strukturell unveränderte Proteinakkumulationen mit schwachen Interaktionen (Bitan et al. 2002; Chiti und Dobson 2017). Durch einen thermodynamisch ungünstigen Prozess kann sich ein sogenannter Fibrillennukleus bilden, indem die Proteine eine definierte Struktur einnehmen (Serio et al. 2000; Bleiholder et al. 2011; Plakoutsi et al. 2005). Das Protein Aß kann auch monomere Nuklei bilden (Chiti und Dobson 2017). Insbesondere die β-Faltblattausbildung der Aminosäurereste 15 bis 21 fördert die Formation eines Fibrillennukleus (Hsu et al. 2018). Die Bildung eines primären Nukleus gilt als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Amyloidfibrillenbildung (Jarrett und Lansbury 1993). Sobald der primäre Nukleus geformt ist, kann dieser durch die Addition von Monomeren schnell wachsen (Jarrett und Lansbury 1993). Die Polymerisation kann zu der Bildung einer Amyloidfibrille oder zu der Bildung von sekundären Nuklei führen (Chiti und Dobson 2017). Die sekundäre Nukleation beschreibt die Dissoziation des polymerisierten primären Nukleus, bei der neue Nuklei gebildet werden, die ebenfalls polymerisieren können (Chiti und Dobson 2017). Die sekundäre Nukleation scheint bei der Aggregation von Aß und Tau entscheidend zu sein (Knowles et al. 2009; Ramachandran und Udgaonkar 2012; Cohen et al. 2013).

Die polymorphen Amyloidfibrillen, die einen Durchmesser von ungefähr 10 nm haben und aus zwei Protofibrillen bestehen, sind geordnet und unlöslich (Jarrett und Lansbury 1993; Chiti und Dobson 2017; Miyakawa et al. 1986). Sie besitzen β-Faltblattstrukturen und sind durch weitere intramolekulare Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Kräften stabiler als der native Zustand (Chiti und Dobson 2017). Amyloidfibrillen besitzen aufgrund der Ausbildung von β-Faltblattstrukturen eine gesteigerte Farbaffinität (Chiti und Dobson 2017). Für die Untersuchung der Alzheimerablagerungen wird oftmals der Farbstoff Thioflavin verwendet, der die aggregierten Strukturen anfärbt (Hsu et al. 2018). Die Zunahme der Farbaffinität, die mit der Bildung von Amyloidfibrillen gleichzusetzen ist, zeigt einen sigmoidalen Verlauf (Chiti und Dobson 2017). Der sigmoidale Verlauf wird in drei Phasen eingeteilt (Abbildung 3) - die Lag-Phase, die Exponentialphase und die Plateauphase (Chiti und Dobson 2017). In jeder Phase finden die Prozesse der primären und sekundären Nukleation sowie die Polymerisation der gebildeten Nuklei statt, jedoch überwiegt in einer Phase meistens ein Prozess (Arosio et al. 2015). In der Lag-Phase überwiegt die primäre Nukleation und die Elongation der primären Nuklei (Chiti und Dobson 2017). Die Länge der Lag-Phase ist abhängig von der Proteinkonzentration und der Bildung des Nukleus (Jarrett und Lansbury 1993; Hofrichter et al. 1974). Die Exponentialphase umfasst die Bildung der sekundären Nuklei samt ihrer Elongation (Chiti und Dobson 2017). In der Plateauphase besteht ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Amyloidfibrillen (Jarrett und Lansbury 1993).



Abbildung 3: Darstellung der nukleationsabhängigen Amyloid-Aggregation in Abhängigkeit der Zeit. In Nukleationsphase (entspricht Lag-Phase) dominiert Bildung der Oligomere. Elongationsphase (entspricht Exponentialphase) umfasst Bildung der Amyloidfibrillen. Grüne Kurve zeigt sigmoidalen Verlauf einer langsamen Lag-Phase und einer schnellen Exponentialphase. Rote Kurve zeigt verkürzte Lag-Phase durch Zugabe von präformierten Nuklei. Abbildung entstammt Kumar und Walter (2011) und wurde mit der Creative-Commons-Lizenz CC BY 3.0 publiziert.

Amyloidfibrillen sind relativ widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen sind und besitzen pathogene Eigenschaften (Chiti und Dobson 2017). Beispielsweise beeinträchtigen sie die Funktion des Proteostasenetzwerks und dienen als Reservoir für Oligomere (Cohen et al. 2013; Balchin et al. 2016). Als Oligomere werden alle Intermediate vom Dimer bis zur Protofibrille bezeichnet (Youmans et al. 2012). Oligomere können entweder initial oder aus Fibrillen gebildet werden (Chiti und Dobson 2017). Sie sind in ihrer Morphologie heterogen (Tabaton und Piccini 2005). Die initialen Akkumulationen interagieren nur schwach, sind dementsprechend instabil und behalten die Struktur des Monomers (Bleiholder et al. 2011; Serio et al. 2000). Sie können transient vorkommen oder bei fortschreitender Akkumulation intrinsisch umstrukturiert werden, um wie die Amyloidfibrillen β-Faltblätter auszubilden (Chiti und Dobson 2017). Durch die Reorganisation gewinnt das Oligomer an Größe, Dichte und Stabilität (Chiti und Dobson 2017). Besonders die anfänglich löslichen Oligomere, die aus mehr als drei Proteinen bestehen, werden als stark neurotoxisch eingestuft, da sie direkt zu Zellschäden führen (Huber et al. 2018; Chiti und Dobson 2017). Beispielsweise lösen Oligomere im frühen Stadium von Alzheimer pathogene Kaskaden aus, die zur Neurodegeneration beitragen (Shin et al. 2020). Noble et al. (2013) beschreibt jedoch Tau-Oligomere, die sich physiologisch bilden und nicht toxisch erscheinen.

Die Pathogenität wird den vielen hydrophoben Resten an der Oberfläche der Oligomere zugeschrieben. Die hydrophoben Reste scheinen durch die Ausbildung von β-Faltblattstrukturen in dem Aggregat gebunden zu werden (Chiti und Dobson 2017).

#### 1.2.3 Aufbau und Eigenschaften der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen

Die Alzheimeraggregate – Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen – besitzen eine morphologische Vielfalt und können sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen werden. Die Aβ-Plaques, die aus ungefähr 900 Proteinen gebildet werden, bestehen hauptsächlich aus dem Protein Aß und zusätzlich amyloidbindenden Proteinen wie ApoE, Ubiquitin und Gliazellproteinen (Drummond et al. 2018). Es werden diffuse und dichte Aβ-Plaques beschrieben (Abbildung 4). Post mortem Analysen von Alzheimerpatienten und -patientinnen zeigen, dass sich im Zentrum des Aggregats ein Kern aus angeordneten Amyloidfibrillen bildet (Hardy und Allsop 1991; Miyakawa et al. 1986). Dichte Plaques weisen einen hohen Anteil an strukturierten Amyloidfibrillen im zentralen Kern auf (Wippold et al. 2008; Schmidt et al. 1995). Diffuse Plaques scheinen einen geringeren bis keinen Anteil an strukturierten Amyloidfibrillen zu besitzen (Wippold et al. 2008; Schmidt et al. 1995). Die diffusen Plaques werden teilweise als unreife Plaques beschrieben, da sie in manchen Studien als Vorläufer der dichten Plaques angenommen werden, die im Gegensatz zu den dichten Plaques nicht neurotoxisch wirken (Dickson et al. 1991; Urbanc et al. 1999; Thal et al. 2006). Andere Studien zeigen, dass diffuse und dichte Plaques in allen Alzheimerformen auftreten und ähnliche Eigenschaften besitzen (Urbanc et al. 1999). Dementsprechend unterscheiden sich die Plaques nur in ihrer Morphologie. Teilweise konnten bereits 20 Jahre vor dem Beginn der Symptomatik Aβ-Akkumulationen nachgewiesen werden (Tabaton und Piccini 2005).



Abbildung 4: Morphologische Unterschiede der Aβ-Plaques: A) dichte Aβ-Plaques und B) diffuse Aβ-Plaques. Abbildung wurde modifiziert und wiederveröffentlicht mit Erlaubnis von der American Association of Neuropathologists aus dem Artikel von Thal et al. (2000) Abbildung 1, Genehmigung wurde vom Copyright Clearnace Center übertragen

Die Tau-Neurofibrillen (NFT), die sich ebenfalls über Monate bis Jahre bilden, bestehen aus gepaarten geraden oder helikalen Filamenten (Miyasaka et al. 2005; Takashima 2013). Die NFTs

enthalten ungefähr 500 Proteine, die aus dem Protein Tau und taubindenden Proteinen wie Hitzeschockproteinen oder zytoskelettalen Proteinen zusammengesetzt werden (Drummond et al. 2018). Außerdem zeigen sie eine große Resistenz gegenüber der Proteostase und verbleiben auch nach der Zelldegeneration stabil (Miyasaka et al. 2005). Die Aggregate des extrazellulären Taus werden teilweise auch als ghost-tangles bezeichnet und scheinen eine andere Bindungsaffinität zu besitzen (Miyasaka et al. 2005). Sowohl Aβ-Plaques als auch Tau-Neurofibrillen besitzen eine neurotoxische Wirkung, sodass sie zu dystrophischen Neuriten, einem gestörten Axontransport und durch die Aktivierung der Mikroglia zu einer Neuroinflammation führen können (Gowrishankar et al. 2015; Tiwari et al. 2019). Infolgedessen führen die Aggregate in gegenseitiger Beeinflussung zu einer Neurodegeneration und Ausbreitung der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen (Tiwari et al. 2019). Insbesondere gekürzte Tau-Proteine, die bspw. durch die Caspase 3 ausgelöste proteolytische Spaltung entstehen, und am N-Terminal gekürzte Aβ-Proteine, die vermehrt in FAD auftreten, zeigen ein besonders hohes Aggregationspotenzial und bilden häufig das Zentrum des Aggregats (Cho und Johnson 2004; Russo et al. 2000).

#### 1.2.4 Metabolismus der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen

Aβ- und Tau-Aggregate bilden sich Jahre, bevor die Symptomatik von Alzheimer beginnt. Im Krankheitsverlauf können sich die Aggregate im Gehirn ausbreiten. Eine besonders starke Ablagerung von Aβ zeigt sich beim Übergang in die klinisch auffällige Alzheimerdemenz (Kadir et al. 2012). Sobald ein moderater Schweregrad von Alzheimer erreicht ist, scheint die Ausbreitung zu stagnieren (Kadir et al. 2012; Villemagne et al. 2011). Post mortem Analysen von humanen Hirnschnitten unterstützen diese Annahme, da Aβ-Plaques unabhängig vom Schweregrad der Demenz 15-20% der gesamten Kortexoberfläche einnehmen (Urbanc et al. 1999). Zugleich werden die Proteine APP und Tau weiterhin produziert, obwohl ihre Transkription herunterreguliert wird (Ciryam et al. 2016). Zudem scheint die Größe der Plaques im Krankheitsverlauf stabil zu bleiben und vom Beginn der Alzheimererkrankung abhängig zu sein, da die Plaques bei Alzheimererkrankten mit frühem Beginn größer als die Plaques beim späten Beginn sind (Serrano-Pozo et al. 2012).

Außerdem zeigen sich (Abbildung 6) größere Plaques bei Alzheimer im Vergleich zu den Plaques bei Nicht-Alzheimererkrankten (Serrano-Pozo et al. 2012). Über das Wachstum entstehender Plaques und den Metabolismus bereits existierender Plaques ist wenig bekannt. Mikroskopisch werden, wie in Abschnitt 1.2.3 beschrieben, diffuse und dichte Plaques unterschieden (Schmidt et al. 1995). Es existieren verschiedene Hypothesen bezüglich des Wachstums der dichten Plaques. Einerseits wird die Bildung eines zentralen strukturierten Kerns aus Amyloid-fibrillen beschrieben (Miyakawa et al. 1986). In der Peripherie dieser Plaques zeigt sich ein Kranz

aus Monomeren oder Oligomeren, die noch keine  $\beta$ -Faltblattstruktur ausgebildet haben (Schmidt et al. 1995). Andererseits werden Plaques mit unstrukturiertem Zentrum dargestellt, die von einem strukturierten Kranz umgeben sind (Jin et al. 2003). Bei diesen Plaques wird entweder eine intrinsische Umstrukturierung oder ein Wachstum der peripheren Amyloidfibrillen Richtung Plaquezentrum vermutet (Jin et al. 2003). Aufgrund von technischen Limitationen ist über das Wachstum der Plaques wenig bekannt. Post mortem Untersuchungen zeigen lediglich den Zustand des Ablebens. Ante mortem durchgeführte PET-Studien können zwar noninvasiv die A $\beta$ -Last anzeigen, jedoch kann die gesamte A $\beta$ -Last nicht dargestellt und nur eine relativ kurze Bildgebungszeit gewährleistet werden, bis das Kontrastmittel nachlässt (Matveev et al. 2014; Suppiah et al. 2019). Somit ist es nicht möglich Veränderungen in den Plaques festzustellen.



Abbildung 5: Korrelationen der Plaquegröße in Abhängigkeit des Krankheitsverlaufs und in Abhängigkeit des Alters bei Symptombeginn (A, B, C, D). Messungen von der 10D5-positiven Plaquegröße und der Thioflavin-S-positiven Plaquegröße korrelieren nicht mit Krankheitsverlauf (A, B). Die Messungen zeigen eine stark negative Korrelation mit dem Alter bei Symptombeginn (C, D). Graphen repräsentieren Mediane der Größenverteilung von Alzheimerpatienten und -patientinnen. Wiederveröffentlicht mit Erlaubnis von der Oxford University Press aus dem Artikel von Serrano-Pozo et al. (2012) Abbildung 2, Genehmigung wurde vom Copyright Clearnace Center übertragen

Aus diesem Grund wurden transgene Mäuse entwickelt, um bestimmte Aspekte wie beispielsweise das Wachstum der Plaques in der Alzheimerkrankheit zu untersuchen, obwohl die Mäuselinien nicht das komplette Krankheitsbild darstellen können (Castellani et al. 2006; Esquerda-Canals et al. 2017). Die transgenen Mäuse entwickeln innerhalb weniger Tage bis Wochen Plaques, die stabil in Größe und Morphologie verbleiben (Meyer-Luehmann et al. 2008; Christie et al. 2001; Yan et al. 2009; Burgold et al. 2011). Auch in den Mäusestudien zeigen sich polymorphe Aggregate, die in diffuse Plaques und dichte Plaques mit strukturiertem oder unstrukturiertem Zentrum unterschieden werden (Nilsson et al. 2007). Das Plaquewachstum ist vom Alter der Maus, der Proteinkonzentration und der reaktiven Mikroglia abhängig (Yan et al. 2009; Meyer-Luehmann et al. 2008). Möglicherweise bildet sich zunächst ein stabiles Zentrum, an das sich Aβ-bzw. Tau- Proteine konzentrationsabhängig anlagern können (Michno et al. 2021; Yan et al. 2009). Durch die Aktivierung von Gliazellen und anderen Gewebefaktoren könnten die Plaques in ihrem Wachstum gestört werden, sodass sich ihre Größe nicht mehr verändert (Yan et al. 2009; Meyer-Luehmann et al. 2008). Die neusynthetisierten Proteine Aß oder Tau könnten ein Gleichgewicht im An- und Abbau besitzen, sodass sich die Proteine nicht mehr in die Aggregate des menschlichen Gehirns einlagern können (Hyman et al. 1993). Da sich die Proteinakkumulationen über viele Jahre entwickeln, sich dann in ihrer Größe nicht mehr ändern und in ihrer Ausbreitung stagnieren, wird eine strukturelle Stabilität der Plaques angenommen (Wildburger et al. 2018; Kadir et al. 2012; Serrano-Pozo et al. 2012). Dennoch konnten bei Alzheimererkrankten durch den Einbau stabiler Isotope dynamische Plaques nachgewiesen werden (Wildburger et al. 2018). Dementsprechend könnten sich die Plaques auch in einem dynamischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung befinden, sodass die konstante Plaqueanzahl auf ein Gleichgewicht zwischen Aggregation und Disaggregation der Plaques zurückgeführt werden kann (Cruz et al. 1997; Wildburger et al. 2018).



Abbildung 6: Vergleich der Plaquegrößenverteilung zwischen Alzheimer- und Nicht-Alzheimererkrankten (A, B). 10D5-positive Plaques von Alzheimer- und Nicht-Alzheimererkrankten zeigen keine signifikanten Unterschiede (A) dichte Thioflavin-S-positive Plaques sind bei Alzheimererkrankten signifikant größer als die Plaques der Nicht-Alzheimererkrankten (B). Streudiagramm zeigt Mediane der Plaquegrößenverteilung von Alzheimer- und Nicht-Alzheimererkrankten. Wiederveröffentlicht mit Erlaubnis von der Oxford University Press aus dem Artikel von Serrano-Pozo et al. (2012) Abbildung 1, Genehmigung wurde vom Copyright Clearnace Center übertragen

### 1.3 Ziel der Arbeit

Seitdem Alois Alzheimer 1906 erstmals die Plaques und Neurofibrillen beschrieb, wurde viel zu der nach ihm benannten Krankheit geforscht. Trotzdem verbleiben einige Aspekte der Erkrankung ungeklärt. Unter anderem ist bisher wenig über den Metabolismus der Aggregate bekannt. Es wird kontrovers diskutiert, ob die Plaques eine strukturelle Stabilität oder ein dynamisches Gleichgewicht mit ihrer Umgebung aufweisen. Aus diesem Grund ist das Ziel dieser Arbeit, den Metabolismus der Aβ- und Tau-Aggregate zu untersuchen. Hierfür wurde die Nanoskala-Sekundärionen-Massenspektrometrie (NanoSIMS) verwendet (Abbildung 7). Die Technik beruht auf der Bildung eines negativ- oder positivgeladenen Primärionenstrahls, der senkrecht auf die Oberfläche des Präparats trifft und Sekundärionen herauslöst. Die Sekundärionen weisen eine entgegengesetzte Ladung zum Primärionenstrahl auf und können sich deshalb koaxial zum Primärionenstrahl ausbreiten. Anschließend werden die Sekundärionen durch ein Massenspektrometer getrennt und gemessen. Es entstehen sieben quantitative Bilder, von denen sechs aus gemessenen Isotopen und eins durch Elektronen gebildet werden. Mithilfe von NanoSIMS soll der Einbau von verschiedenen Isotopen untersucht werden. Es wurden die zwei transgenen Mäuselinien 5xFAD und Tau-P301L ausgewählt, um sowohl die Aβ-Plaques als auch die Tau-Neurofibrillen untersuchen zu können. Die 5xFAD-Mäuselinie besitzt fünf familiäre Alzheimer-Mutationen, von denen drei im APP-Gen und zwei im PSEN-1-Gen liegen, die zu einer Überexpression von APP und zu einer Bildung von Aβ-Plaques führen. Die Tau-P301L-Mäuselinie, deren Mutation im MAPT-Gen liegt, bildet hingegen Tau-Aggregate. Die Mäuse wurden über drei Wochen mit <sup>13</sup>C-Lysin reicher Nahrung gefüttert. Lysin ist eine Aminosäure, die für die Produktion von neuen Proteinen benötigt wird. <sup>13</sup>C ist ein stabiles Isotop, welches physiologisch zu 1,05% vorkommt und als nicht toxisch gilt. Mit der Fluoreszenzmikroskopie wurden Fluoreszenzbilder erstellt, in denen die Plaques lokalisiert werden. Die Inkorporation von <sup>13</sup>C in die Plaques im Vergleich zu anderen zellulären Bereichen soll mit NanoSIMS bestimmt werden. Zusätzlich wurde der <sup>13</sup>C-Einbau vom Zentrum bis in die Peripherie der Aggregate untersucht. Wenn sich dabei eine deutliche Inkorporation von <sup>13</sup>C in den Aggregaten zeigt, können dynamische Plaques vermutet werden. Stabile Plaques hingegen würden keinen bzw. lediglich in der Peripherie einen <sup>13</sup>C-Einbau aufweisen. Zusätzlich soll mit dieser Technik der Phosphorylierungsgrad der Aggregate bestimmt werden, um zu überprüfen, ob eine verstärkte Phosphorylierung der Proteine Aβ- und Tau aggregationsfördernd wirkt.



Abbildung 7: Aufbau NanoSIMS mit Darstellung der Primärionenquelle zur Generierung des Primärionenstrahls (gelb), anschließende Bildung des Sekundärionenstrahls (rot) und Trennung in Massenspektrometer (gelb). Abbildung entstammt Richter et al. (2017) und wurde mit der Creative-Commons-Lizenz CC BY 3.0 publiziert

### 2 Material und Methoden

Die transgenen Mäuse wurden zunächst im deutschen Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) von der Forschungsgruppe Schneider mit <sup>13</sup>C-Lysin gefüttert und präpariert. Die Präparate aus den Gehirnen der Mäuse dienten anschließend der Herstellung der Fluoreszenzbilder am Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Göttingen und der NanoSIMS-Bilder am Leibniz Institut für Ostseeforschung in Warnemünde (IOW). Die anschließende Bildbearbeitung sowie die Bildanalyse wurden von der Autorin durchgeführt. In den folgenden Abschnitten werden die Präparation der Mäuse, die Herstellung der Fluoreszenzund NanoSIMS-Bilder sowie die anschließende Bildbearbeitung und -analyse beschrieben.

#### 2.1 Herstellung der Präparate aus transgenen Mäusen

Für die Untersuchung wurden die transgenen Mäuselinien 5xFAD und Tau-P301L (siehe Abschnitt 3.1) genutzt, die Aβ-Plaques bzw. Tau-Neurofibrillen ausbilden (Oakley et al. 2006; Shin et al. 2020). Insgesamt wurden von jeder Mäuselinie drei 27 Wochen alte Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden von der Forschungsgruppe Schneider (Prof. Dr. Anja Schneider und Dr. Beate Koch) am DZNE über drei Wochen mit <sup>13</sup>C-Lysin angereichertem Futter ernährt (Chen et al. 2015). Kohlenstoff besitzt zwei stabile Isotope, von denen <sup>12</sup>C mit 98,95% am häufigsten vorkommt. Das stabile <sup>13</sup>C-Isotop ist zu 1,05% vorhanden (Richter et al. 2017). Mit der Aminosäure Lysin, die neben dem Muskelaufbau auch für den Aufbau von anderen Aminosäuren und Proteinen benötigt wird, sollte das stabile Isotop <sup>13</sup>C in die Zellen der Maus eingebaut werden. Nach 21 Tagen wurden die Mäuse mit 4% igem Paraformaldehyd perfundiert, um die Zellen zu fixieren. Nachfolgend wurden Gehirnschnitte von 100 µm angefertigt und mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die 5xFAD-Mäuse wurden mithilfe des Antikörpers 6E10 angefärbt, der mit den Aminosäureresten 1 bis 16 des humanen A $\beta$ -Proteins reagiert und somit auch APP erkennt (Biolegend 2018; Youmans et al. 2012). Für die Gehirnschnitte der Tau-P301L-Mäuselinie wurde der Antikörper PHF-1 verwendet, der an den phosphorylierten Serinen Ser<sup>396</sup> und Ser<sup>404</sup> des menschlichen Taus bindet (Schmidt et al. 1995; Otvos et al. 1994; Huber et al. 2018). Die Gehirnschnitte wurden anschließend in LR-White, einem Acrylharz, eingebettet. Die Einbettung in LR-White ist mit der nachfolgenden Mikroskopie kompatibel und führt zu einer geringeren Autofluoreszenz des Präparats als andere Einbettungsharze (Saka et al. 2014). Mit einem Mikrotom wurden 200 nm Schnitte aus den eingebetteten Präparaten erstellt.

#### 2.2 Entstehung der zu untersuchenden Bilder aus den Präparaten

Die Präparate dienten der Herstellung von Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bildern. Für jedes Präparat wurden zwei Fluoreszenzbilder und sieben NanoSIMS-Bilder erstellt. Die Fluoreszenzbilder und die Anleitung der NanoSIMS-Aufnahmen wurden durch Dr. Sebastian Jähne (Universitätsmedizin Göttingen) hergestellt. Die NanoSIMS-Bedienung wurde von Dr. Angela Vogts (IOW) durchgeführt. Die Autofluoreszenz wurde im Kanal C = 0 und die Fluoreszenz mit der spezifischen Antikörperfärbung im Kanal C = 1 bildlich dargestellt. In den Fluoreszenzbildern wurden vier Bereiche definiert, die in Abschnitt 2.4 näher erläutert werden. Diese Bereiche konnten mit den NanoSIMS-Bildern auf ihren Metabolismus analysiert werden, indem die <sup>13</sup>C-Inkorporation in neue Proteine sowie der Einbau von Phosphor und Schwefel untersucht wurde.

#### 2.2.1 Fluoreszenzbilder

Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem inversen Mikroskop Eclipse Ti-E der Firma Nikon erstellt. Das Mikroskop war mit einem 100x 1,59 N.A. Objektiv und einer 1,5x Optovarlinse ausgestattet. Vor dem Objektiv war ein Neutraldichtefilter 2 (ND 2) angebracht, der die Lichtintensität um die Hälfte reduzierte, um eine 50% ige Transmission zu erzeugen. Mit der Hochdruck-Quecksilberdampflampe HBO 100 W der Firma Nikon wurde die notwendige Belichtung der Präparate erzeugt. Mithilfe der Software Nikon NIS-Elements konnten die Bilder durch die ladungsgekoppelte Vorrichtungs (CCD)-Kamera Andor iXON X3897 aufgezeichnet werden. Durch die CCD-Kamera wurde das emittierte Licht in elektrische Signale umgewandelt. Mithilfe von Filtersystemen wurde die Fluoreszenz in zwei verschiedenen Kanälen Autofluoreszenz (C = 0) und Fluoreszenz mit spezifischer Antikörperfärbung (C = 1) ermittelt (Abbildung 8). Die Fluoreszenz beschreibt die Emission von Licht, wenn ein Molekül ein Photon abgibt und somit von einem angeregten in einen nicht angeregten Zustand übertritt. Das Abstrahlungslicht ist dabei langwelliger und energieärmer als das Anregungslicht. Um das emittierte Licht vom anregenden Licht zu unterschieden, muss das Licht gefiltert werden. Das Anregungslicht wird durch einen Anregungsfilter getrennt, der vor allem für die Fluoreszenz anregenden Wellenlängen durchlässig ist. Das gefilterte Licht trifft auf das Präparat, wodurch das Abstrahlungslicht entsteht. Dieses Abstrahlungslichtwird wieder in einem Sperrfilter getrennt, der vor allem eine Transmission von energieärmeren Wellenlängen zulässt und das Fluoreszenzlicht herausfiltert. Das Mikroskop Eclipse Ti-E ist ein Auflichtmikroskop, bei dem die Fluoreszenz auf derselben Seite nachgewiesen wird, von der die Anregung erfolgt. Aus diesem Grund wird ein Strahlteiler genutzt, der das Anregungslicht zum Präparat führt und zusätzlich als Sperre für das kurzwellige Licht im Abstrahlungsstrahl fungiert.

Der Kanal C = 0 zeigt die Autofluoreszenz des Präparats bei kurzwelligem Licht. Eine Autofluoreszenz tritt bei konjugierten Doppelbindungen wie zum Beispiel bei Lipidinklusionen oder nach einer Fixierung mit Epoxidharzen auf. Somit ist die Autofluoreszenz relativ unspezifisch und kann zu starken Hintergrundsignalen führen. Für die Autofluoreszenzbilder im Kanal C = 0 wurde der Anregungsstrahl durch den Anregungsfilter mit einer Zentralwellenlänge (CWL) von 470 nm und einer Bandbreite (BW) von 40 nm getrennt. Anschließend traf der gefilterte Anregungsstrahl auf das Präparat und das Abstrahlungslicht entstand. Nur Wellenlängen ab 495 nm wurden durch den Strahlteiler gelassen. Anschließend wurde das Licht durch den Sperrfilter (CWL 525 nm und BW 50 nm) getrennt und somit das Fluoreszenzlicht gefiltert, das von der Kamera aufgefangen wurde.

Im Kanal C = 1 entstand das Fluoreszenzbild mit spezifischer Antikörperfärbung. Hierfür wurde der Anregungsstrahl durch einen Anregungsfilter (CWL 620 nm und BW 60 nm) getrennt. Der Strahlteiler ließ lediglich die Wellenlängen ab 660 nm des Abstrahlungsstrahls durch. Mit dem Sperrfilter (CWL 700 nm und BW 75 nm) wurde das Fluoreszenzlicht herausgefiltert, das mit der Kamera in ein elektrisches Bild umgewandelt wurde. Die Fluoreszenzbilder waren 53,76  $\mu$ m groß.



Abbildung 8: Fluoreszenzbilder mit Autofluoreszenz (Kanal C = 0) und mit spezifischer Antikörperfärbung (Kanal C = 1); grauer Balken entspricht 10  $\mu$ m

#### 2.2.2 NanoSIMS-Bilder

NanoSIMS ist eine destruktive Technik und wird daher erst nach der Anfertigung der Fluoreszenzbilder angewendet. Weil mit NanoSIMS der isotopische Einbau der Präparate gemessen werden kann, wurden die Präparate der transgenen Mäuse auf den Einbau der <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P und <sup>32</sup>S-Isotope untersucht. Hierfür wurden Isotopenverhältnisse genutzt, mit denen bestimmte Bereiche (in Abschnitt 2.4 beschrieben) verglichen wurden, um den Metabolismus in den Aβ- und Tau-Aggregaten zu bestimmen. NanoSIMS ist ein optimiertes Sekundärionen-Massenspektrometer, in dem die Ionenoptiken koaxial ausgerichtet werden. Diese Modifikation führt zwar zu einem kleineren Primärionenspot, erhöht jedoch die Transmission von Sekundärionen und die laterale Auflösung. Es wird ein fokussierter Primärionenstrahl generiert, der senkrecht auf die Oberfläche des Präparats trifft (Abbildung 9). Im betroffenen Bereich werden molekulare Verbindungen getrennt und Atome bzw. Moleküle freigesetzt. Ein Teil der freigesetzten Atome und Moleküle ist ionisiert und bildet den Sekundärionenstrahl. Da sich Primär- und Sekundärstrahl koaxial ausbreiten, weisen sie entgegengesetzte Ladungen auf. Die Sekundärionen können mit dem doppelfokussierenden Massenspektrometer präzise gemessen werden. Hierfür werden die Ionen zuerst in einem elektrostatischen und anschließend in einem magnetischen Sektorfeld nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt. Das magnetische Massenspektrometer zeigt dadurch eine hohe Massenauflösung. Beispielsweise können Isotopenkombinationen wie <sup>12</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup> und <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup> unterschieden werden. Mit dem NanoSIMS 50L können bis zu sieben Isotope gleichzeitig dargestellt werden.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der NanoSIMS-Technik . CS<sup>+</sup>-Primärionenstrahl (blau) trifft auf Präparatoberfläche und generiert koaxialen Sekundärionenstrahl (rot). Massenspektrometer trennt Sekundärionenstrahl und bildet sieben quantitative Bilder (e<sup>-</sup>, <sup>12</sup>C<sup>-</sup>, <sup>13</sup>C<sup>-</sup>, <sup>12</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup>, <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup>, <sup>31</sup>P<sup>-</sup> und <sup>32</sup>S<sup>-</sup>). Abbildung basierend auf Richter et al. (2017) und Saka et al. (2014)

Die Präparate der transgenen Mäuse wurden mit NanoSIMS 50L (Cameca) analysiert. Zuerst wurden die Präparate implantiert, um die Moleküle zu ionisieren. Hierfür wurde eine Fläche von 50  $\mu$ m\*50  $\mu$ m ausgewählt, die für 90 s bei 600 pA implantiert wurde. Die NanoSIMS-Messung erfolgte auf einer Fläche von 18  $\mu$ m\*18  $\mu$ m bei 512\*512 Pixeln. Die Energie des positivgeladenen Primärionenstrahls aus Cäsium-Ionen <sup>133</sup>Cs<sup>+</sup> betrug abhängig vom gewählten Präparat 1 pA bis 2 pA. Jeder Pixel wurde für 4 ms dem Primärionenstrahl ausgesetzt. Mit einer Spannung von 16 keV wurde der Cs<sup>+</sup>-Strahl generiert, der anschließend den negativgeladenen Sekundärionenstrahl bildete. Mit dem Massenspektrometer wurden sechs Isotope <sup>12</sup>C<sup>-</sup>, <sup>13</sup>C<sup>-</sup>, <sup>12</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup>, <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N<sup>-</sup>, <sup>31</sup>P<sup>-</sup>, <sup>32</sup>S<sup>-</sup> und Elektronen e<sup>-</sup> gemessen. Somit entstanden sieben quantitative Bilder für jedes Präparat. Die Bilder wurden in einem 512\*512 Pixelformat mit einer Pixelgröße von 35 nm erstellt. Es wurde eine Ebene analysiert.

### 2.3 Bildbearbeitung mit MATLAB, Image J, Photoshop

Als Vorbereitung für die Bildanalyse mussten die Bilder zunächst bearbeitet, übereinandergelegt und die Fluoreszenzbilder zurechtgeschnitten werden. Die Bilder wurden im Tagged image file Format (TIF-Format) abgespeichert, welches nur schwer manipulierbar ist, da bei der Komprimierung einer TIF-Datei die Daten erhalten werden und die Qualität der Bilder bewahrt wird. Anschließend wurden die Bilder einem Pixel-Binning (Abschnitt 2.3.1) unterzogen und exakt übereinandergelegt. Die Fluoreszenzbilder wurden dann anschließend der NanoSIMS-Bildgröße angepasst. Hierfür wurden die Programme MATLAB, Image J und Photoshop CS6 genutzt.

#### 2.3.1 Pixel-Binning und Anpassung der Bit-Tiefe mit MATLAB

MATLAB ist eine Software des Unternehmens The MathWorks, mit der Daten analysiert und Grafiken erstellt werden können. Die Software MATLAB, die sich aus den Begriffen Matrix und Laboratory ableitet, nutzt für die Berechnungen Matrizen.

Mithilfe der Version MATLAB 7.5.0 wurden ein Pixel-Binning bei den NanoSIMS-Bildern und die Anpassung der Bit-Tiefe bei den Fluoreszenzbildern durchgeführt. Bei einem Pixel-Binning werden benachbarte Bildpixel zu einem Super-Pixel zusammengefasst. Das Binning kann entlang einer Achse oder beider Achsen erfolgen. Für die zu untersuchenden NanoSIMS-Bilder wurde ein 3x3-Binning, auch horizontales und vertikales Binning genannt, genutzt (Abbildung 10). Somit wurden neun Pixel zu einem Superpixel zusammengefasst. Durch den Prozess wird zwar die Bildauflösung reduziert, jedoch die Lichtempfindlichkeit gesteigert und das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert.

Bei den Fluoreszenzbildern wurde lediglich die Bit-Tiefe von 16 Bit auf 8 Bit reduziert. Die Bit-Tiefe beschreibt die Anzahl der möglichen Farbabstufungen in einem Pixel. Ein Bit kann immer zwei Zustände einnehmen. Daher können bei 8 Bit 2<sup>8</sup> Farbstufen und bei 16 Bit 2<sup>16</sup> Farbstufen gezeigt werden. Die Umwandlung der Bit-Tiefe diente der besseren Weiterverarbeitung der Fluoreszenzbilder im Programm Photoshop.



Abbildung 10: Binning der NanoSIMS-Bilder mit MATLAB; links Beispielbild aus 5xFAD-Mäuselinie vor dem Binning, mittig Bildschirmfoto von Binning-Programm in MATLAB und rechts Beispielbild aus 5xFAD-Mäuselinie nach dem Binning

#### 2.3.2 Zuordnung der Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder mit Image J

Image J ist ein Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm, welches für wissenschaftliche Bildanalysen entwickelt wurde. Mithilfe dieses Programms konnten sowohl die Fluoreszenz- als auch die NanoSIMS-Bilder geöffnet werden. Da die NanoSIMS-Bilder nur aus einem Ausschnitt der Fluoreszenzbilder entstanden, besitzen sie eine kleinere Bildgröße. Anhand markanter Strukturen und/oder anhand des Protokolls, in dem von Dr. Sebastian Jähne die ungefähre Region der NanoSIMS-Bilder in den Präparaten gekennzeichnet wurde, konnte der zu den NanoSIMS-Bildern gehörende Bereich in den Fluoreszenzbildern lokalisiert werden. Teilweise mussten die Fluoreszenzbilder in horizontaler Achse umgedreht und für die Weiterverarbeitung abgespeichert werden (Abbildung 11). Anschließend wurde für jedes Bildpräparat ein NanoSIMS- und ein Fluoreszenzbild ausgesucht, deren Kontrast und/oder Helligkeit verändert wurden. Bei den NanoSIMS-Bildern wurden entweder <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N oder <sup>12</sup>C<sup>14</sup>N verwendet, da sie für die anschließende Analyse von Bedeutung waren und weil sie markante Strukturen für die folgende Bearbeitung aufwiesen. Diese bearbeiteten Bilder wurden lediglich als Dopplung für die bessere Bildbearbeitung verwendet und unter einer anderen Bezeichnung als das Originalbild gespeichert. Das Originalbild wurde jedoch nicht verändert.



Abbildung 11: Zuordnung der Bilder mit Image J und horizontale Drehung der Fluoreszenzbilder; kleines Bild in der Mitte: NanoSIMS-Bild aus 5xFAD-Mäuselinie, großes Bild rechts: dazugehöriges Fluoreszenzbild vor der horizontalen Drehung, links: Darstellung der horizontalen Drehung mit Image J

## 2.3.3 Bildbearbeitung und -verschneiden der Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder mit Adobe Photoshop CS6

Adobe Photoshop CS6 ist ein Bildbearbeitungsprogramm, welches für Pixelgrafiken von dem Softwareunternehmen Adobe Inc. entwickelt wurde. In dieser Arbeit wurde es genutzt, um die Fluoreszenzbilder anhand gemeinsamer markanter Strukturen exakt den NanoSIMS-Bildern anzupassen.

Als Erstes wurden die bearbeiteten Bilder in verschiedenen Fenstern geöffnet. Das bearbeitete Fluoreszenzbild wurde dupliziert und dem NanoSIMS-Bild als neue Ebene hinzugefügt. Das NanoSIMS-Bild diente somit als Hintergrund-Ebene und wurde auch als solche betitelt. Anschließend wurden die Original- oder teilweise horizontal umgedrehten Fluoreszenzbilder C = 0 und C = 1 in neuen Fenstern geöffnet und wiederum dem NanoSIMS-Bild hinzugefügt. Im nächsten Schritt wurden die Ebenen von dem kontrastverschärften und von den unbearbeiteten Fluoreszenzbildern gruppiert. Danach wurde ausschließlich mit dem kontrastverschärften Bild gearbeitet, wodurch die anderen Fluoreszenzbilder automatisch verändert wurden. Die originalen Fluoreszenzbilder wurden aufgrund der Übersichtlichkeit unsichtbar gemacht

Im folgenden Schritt wurde der gemeinsame Bereich von Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bild identifiziert, indem Dichte und Transparenz des Fluoreszenzbildes variiert wurden. Mithilfe weiterer Bearbeitungswerkzeuge wie "verzerren", "verkrümmen" oder "rotieren" konnten die Fluoreszenzbilder dahingehend bearbeitet werden, dass auffällige Bereiche, Geweberänder oder Artefakte schließlich passend aufeinanderlagen (Abbildung 12). Die leichten Abweichungen zwischen den Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bildern können eventuell auf einen nicht komplett senkrecht zum Präparat ausgerichteten Primärionenstrahl zurückzuführen sein, sodass die Sekundärionen nicht vollständig senkrecht zur Oberfläche herausgelöst wurden. Abschließend wurden die Fluoreszenzbilder auf die Größe der NanoSims-Bilder zugeschnitten und die verbundenen Ebenen getrennt. Die zugeschnittenen Fluoreszenzbilder C = 0 und C = 1 konnten nun dupliziert, in einem neues Photoshop-Fenster geöffnet und als TIF-Datei gespeichert werden.



Abbildung 12: Bildbearbeitung und -verschneiden der Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder mit Adobe Photoshop CS6; Mitte: übereinandergelegte NanoSIMS-, Original- und bearbeitete Fluoreszenzbilder mit reduzierter Dichte, rechts: Darstellung die Gruppierung der Fluoreszenzbilder, links: Darstellung der Bearbeitungswerkzeuge

### 2.4 Bildanalyse

Im Anschluss an die Bildbearbeitung wurden bestimmte Bildareale auf ihren Proteinmetabolismus untersucht. Hierfür wurden die gebinnten originalen NanoSIMS-Bilder und die zwei in Adobe Photoshop CS6 bearbeiteten und zugeschnittenen Original-Fluoreszenzbilder verwendet. Abhängig von den fluoreszierenden Signalen in C = 0 und C = 1 wurden vier Bereiche, sogenannte Regions of interest (ROI), definiert. Wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, spiegelt das eine Fluoreszenzbild die Autofluoreszenz wider, das andere die spezifische Antikörperfärbung an A $\beta$  bzw. Tau. Bestimmte Signale überlappten sich in beiden Fluoreszenzbildern. Diese Areale wurden als Aggregate bezeichnet, da Plaques die markierten Proteine A $\beta$  oder Tau beinhalten und durch Lipidinklusionen eine Autofluoreszenz zeigen. Bereiche, die nur eine spezifische Antikörper-Färbung aufwiesen, deuten auf überexprimierte Proteinansammlungen hin und wurden daher als Nicht-Aggregate definiert (Abbildung 13). Da rein autofluoreszierende Bereiche verschiedene Ursachen besitzen können, wurden diese Areale als unspezifisches Signal bezeichnet. Als vierter Bereich wurde der Hintergrund festgelegt, der weder in der Autofluoreszenz noch in der Antikörperfärbung Signale zeigte.

Diese ROIs wurden in den Fluoreszenzbildern markiert. Mithilfe der Programme MATLAB und Image J konnten die Markierungen auf ausgewählte NanoSIMS-Bilder übertragen und der isotopische Einbau gemessen werden. Die Kategorisierung wurde für jedes Präparat einzeln durchgeführt. Mit Excel konnten aus den gemessenen Ionenwerten die Isotopenverhältnisse errechnet werden. Die Isotopenverhältnisse wurden von allen Präparaten einer transgenen Mäuselinie zusammengefasst und anschließend statistisch analysiert. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch das Programm Inkscape, welches der Bearbeitung und Erstellung von Vektorgrafiken dient. In den folgenden Abschnitten wird genauer beschrieben, wie die Markierungen gesetzt und ausgewertet wurden.



Aggregat
 Nicht-Aggregat
 unspezifisches Signal
 Hintergrund
 entspricht 5 µm

Abbildung 13: Einteilung der vier Bereiche durch Signale in den Fluoreszenzbildern; Aggregat (blau), Nicht-Aggregat (rot), unspezifisches Signal (grün) und Hintergrund (gelb), grauer Balken entspricht 5 μm
### 2.4.1 Untersuchung der ROIs durch Bestimmung der Isotopenverhältnisse

Um Bereiche auf ihren isotopischen Aufbau zu untersuchen, wurden die Fluoreszenzbilder und NanoSIMS-Bilder eines Präparats in einem in MATLAB konzipierten Makro geöffnet. Das Makro wurde von Prof. Silvio Rizzoli geschrieben und von Dr. Sebastian Jähne modifiziert. Dieses Programm erstellte eine Grafik, in der jedes Bild eine eigene Ebene bildete. In den Fluoreszenzbildern wurden daraufhin kreisförmige Markierungen gesetzt, die durch das Programm auf alle weiteren Bilder übertragen wurden. Die Markierungen besaßen einen Radius von drei Pixeln. Als Erstes wurden die Aggregate markiert und als Matrizen abgespeichert. Diese Matrizen enthielten Informationen über die Intensität der Markierungen in den Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bildern. Mit Excel wurden diese Matrizen konvertiert und eine Tabelle erstellt, deren Spalten die Informationen über die untersuchten Isotope und die Zeilen die gemessenen Intensitäten der Markierungen zeigten. Aus diesen Intensitäten wurden mit Excel die isotopischen Verhältnisse von <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N, <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S ermittelt. Die Errechnung der Verhältnisse ist eine gängige Methode, um den Einbau der Isotope in Proteine zu ermitteln. Das Verhältnis von <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N ist präziser als <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, da das Verhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N nicht so anfällig gegenüber Kontaminationen wie Schmutz, Einbettungsmaterialien oder Fixierungsmittel ist (Kabatas et al. 2015). Das Verhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N dient somit der Quantifikation von neuen Amino-, Nuklein- oder Fettsäuren. Der Phosphorylierungsgrad der Proteine kann mit <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N bestimmt werden (Chen et al. 2015). Das Verhältnis von Phosphor zu Schwefel zu errechnen, ist eine andere Möglichkeit für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrads. Das Isotop <sup>32</sup>S, welches physiologisch zu 95% vorkommt, wird lediglich in zwei Aminosäuren eingebaut (Rappel und Schaumlöffel 2008). Da die beiden Aminosäuren, Methionin und Cystein, jedoch in fast jedem Protein vorkommen, dient die Bestimmung des Schwefeleinbaus der Proteinquantifikation (Rappel und Schaumlöffel 2008). Bei einem niedrigen Verhältnis von <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S kann ein geringer Grad an Phosphorylierung angenommen werden.

Abschließend wurden die kreisförmigen Markierungen der Aggregate entfernt. Daraufhin wurde der Vorgang, in dem Markierungen gesetzt, abgespeichert und die Isotopenverhältnisse errechnet wurden, für die anderen Bereiche Nicht-Aggregat, unspezifisches Signal und Hintergrund separat wiederholt. Insgesamt konnten für jedes Präparat bis zu vier Tabellen erstellt werden, wenn alle zu untersuchenden Bereiche in den Bildern vorhanden waren.

Nach abgeschlossener Untersuchung der Bereiche wurden die Ergebnisse aller Präparate einer Mäuselinie zusammengeführt. Für jede Mäuselinie entstanden drei Tabellen, in denen die errechneten Isotopenverhältnisse <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N, <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S der untersuchten Bereiche zusammengefasst wurden. Durch die anschließende statistische Untersuchung konnten die

Bereiche Aggregat, Nicht-Aggregat, unspezifisches Signal und Hintergrund auf Unterschiede in ihrem isotopischen Einbau untersucht werden.

### 2.4.2 Untersuchung der ROIs mithilfe von Linescans

Nach der Untersuchung der definierten Bereiche sollten die Signale Aggregat, Nicht-Aggregat und unspezifisches Signal auf ihren Isotopeneinbau vom Zentrum bis in die Peripherie untersucht werden (Abbildung 14). Hierfür wurden mit dem Programm Image J sogenannte Linescans gebildet. Die Linescans wurden ebenfalls in den Fluoreszenzbildern angelegt. Es wurde darauf geachtet, dass ausschließlich horizontale bzw. vertikale Linien gezogen wurden. Da die Länge der Linescans in Pixel angegeben wurde, konnte somit eine einheitliche Größe der Pixel gewährleistet werden. Als Vorbereitung der Linescans wurden die beiden Fluoreszenzbilder übereinandergelegt und jeweils einer Farbe zugeordnet. Somit war eine visuelle Unterscheidung zwischen Aggregaten, Nicht-Aggregaten und unspezifischen Signalen gegeben. Die Linescans hatten ihren Anfang im Zentrum des Signals, ihre Mitte im Randbereich des Signals und ihr Ende in der Peripherie. Zunächst wurden die Linescans für die Aggregate gezogen und deren Lokalisation in einer Datei gespeichert. Anschließend wurden die NanoSIMS-Bilder <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>12</sup>C<sup>14</sup>N geöffnet und die Linescans auf sie übertragen. Daraufhin konnte der Isotopeneinbau gemessen und die Daten in Excel gesichert werden. Abschließend wurde das isotopische Verhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N errechnet. Mit der gleichen Prozedur wurden die Linescans für die Nicht-Aggregate und unspezifischen Signale fortgeführt. Nachdem für alle Präparate einer Mäuselinie Linescans durchgeführt wurden, konnten die Isotopenverhältnisse von zentral nach peripher zusammengeführt werden. Durch anschließende statistische Analysen konnten Unterschiede zwischen dem isotopischen Einbau im Zentrum und in der Peripherie untersucht werden.



Aggregat
 Nicht-Aggregat
 unspezifisches Signal
 entspricht 5 µm

Abbildung 14: Linescans in den drei definierten Bereichen Aggregat (blau), Nicht-Aggregat (rot) und unspezifisches Signal (grün), grauer Balken entspricht 5 µm

#### 2.4.3 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen R und MATLAB durchgeführt. Es wurde zunächst der Shapiro-Wilk-Test verwendet, um die Normalverteilung der Stichproben zu überprüfen. Da bei vielen Stichproben keine Normalverteilung anzunehmen war, wurden anschließend die nichtparametrischen Tests nach Wilcoxon und nach Kruskal-Wallis mit dem Posthoc-Test nach Tukey durchgeführt, um die definierten Bereiche und Linescans zu analysieren.

### 2.4.3.1 Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung

Der Shapiro-Wilk-Test ist ein starker Test auf Normalverteilung, der bereits bei kleinen Stichproben angewendet werden kann. Die Testgröße W wird aus dem Quotienten zweier Schätzungen für die Varianz – der unter Normalverteilung erwarteten Varianz der Stichprobe und der unkorrigierten Stichprobenvarianz – gebildet. Daher kann die Testgröße Werte von 0 bis 1 einnehmen. Je näher die Testgröße W am Quotienten 1 liegt, desto wahrscheinlicher ist eine Normalverteilung.

Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Normalverteilung angenommen bzw. abgelehnt werden kann. Die Testentscheidung ist abhängig vom festgelegten Signifikanzniveau  $\alpha$ . Das Signifikanzniveau ist die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit und gibt die Wahrscheinlichkeit für einen  $\alpha$ -Fehler an. Bei einem  $\alpha$ -Fehler wird irrtümlich die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen. Um das Risiko für einen  $\alpha$ -Fehler zu minimieren, sollte ein niedriges Signifikanzniveau festgelegt werden. Wie in der medizinischen Forschung gebräuchlich, wurde in dieser Arbeit das Signifikanzniveau auf 5% festgelegt. Wenn eine Fehlerwahrscheinlichkeit unter 5% vorliegt, kann das Ergebnis mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit als signifikant betrachtet werden. Liegt der p-Wert beim Shapiro-Wilk-Test unter 0,05, sollte die Annahme der Normalverteilung verworfen werden. Bei einem p-Wert > 0,05 kann eine Normalverteilung angenommen werden.

Der Shapiro-Wilk-Test zeigte, dass bei vielen Stichproben keine Normalverteilung anzunehmen war (in Abschnitt 3 beschrieben).

#### 2.4.3.2 Nichtparametrischer Wilcoxon-Test

Ein nichtparametrischer Test ist verteilungsunabhängig. Er wird angewendet, wenn bestimmte Voraussetzungen wie die Annahme der Normalverteilung nicht erfüllt sind und daher kein parametrischer Test durchgeführt werden kann.

Der Wilcoxon-Test kann sowohl für abhängige als auch für unabhängige Stichproben verwendet werden und stellt die nichtparametrische Alternative zum t-Test dar. Der Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben, auch Mann-Whitney-U-Test genannt, vergleicht zwei unabhängige Stichproben miteinander. Der Vergleich erfolgt durch den Rangsummentest nach Wilcoxon, in dem die Prüfgrößen aus den Rangzahlen der Stichproben und nicht deren tatsächlichen Werten errechnet werden. Der resultierende p-Wert zeigt, ob ein signifikanter Unterschied vorliegt. Liegt bei einem Signifikanzniveau von 5% ein p-Wert < 0,05 vor, kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben angenommen werden. Je kleiner der p-Wert ist, desto unwahrscheinlicher ist das Risiko eines  $\alpha$ -Fehlers.

Der Wilcoxon-Test mit unabhängigen Stichproben wurde für den Vergleich des isotopischen Einbaus in den vier Bereichen Aggregat, Nicht-Aggregat, unspezifisches Signal und Hintergrund genutzt.

#### 2.4.3.3 Nichtparametrischer Kruskal-Wallis-Test mit Posthoc-Test nach Tukey

Der Kruskal-Wallis-Test ist ein nichtparametrischer Test, der bei mehr als zwei zu vergleichenden Stichproben angewendet wird. Er ist ein Rangsummentest und stellt somit eine Erweiterung zum Wilcoxon-Test mit zwei unabhängigen Variablen dar. Als ein nichtparametrischer Test kann der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt werden, wenn eine Normalverteilung für die einfaktorielle Varianzanalyse nicht gegeben ist. Der Kruskal-Wallis-Test wird auch als H-Test bezeichnet. Ein signifikantes Testergebnis bei p < 0.05 weist lediglich auf die Möglichkeit hin, dass ein Unterschied zwischen den Stichproben bestehen könnte. Wie die einfaktorielle Varianzanalyse enthält der Kruskal-Wallis-Test keine Informationen darüber, zwischen welchen Variablen ein Unterschied besteht und ob dieser signifikant ist. Daher werden sogenannte Posthoc-Tests durchgeführt, bei denen die Variablen paarweise miteinander verglichen werden. Ein häufig angewendeter Posthoc-Test ist der Tukey-Test, bei dem eine Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers durchgeführt wird, sodass die Wahrscheinlichkeit eines α-Fehlers bei allen paarweisen Vergleichen 5% nicht überschreitet. So wird das Problem der α-Fehler-Kumulierung, welches bei multiplen paarweisen Tests wie dem Mann-Whitney-U-Test entsteht, umgangen. Im Vergleich zu den multiplen paarweisen Vergleichen werden weniger Unterschiede als signifikant eingestuft. Ein signifikanter Unterschied wird angenommen, wenn der aus dem Tukey-Test resultierende p-Wert < 0,05 ist.

Der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Posthoc-Test nach Tukey wurde von Prof. Silvio Rizzoli durchgeführt, um signifikante Unterschiede zwischen Zentrum und Peripherie der Linescans in den Bereichen Aggregat, Nicht-Aggregat und unspezifisches Signal zu finden.

## 3 Ergebnisse

Alzheimer, die häufigste neurodegenerative Erkrankung, ist durch die Aggregation der Proteine Aß und Tau gekennzeichnet. Obwohl seit Jahrzehnten die Pathologie von Alzheimer erforscht wird, ist bisher wenig über den Metabolismus der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen bekannt. Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob die Aggregate eine strukturelle Stabilität aufweisen oder in einem dynamischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung stehen und ob die Aggregate eine Hyperphosphorylierung aufzeigen. Hierfür wurde der Einbau verschiedener Isotope – <sup>13</sup>C und <sup>31</sup>P – mithilfe der Nanoskala-Massenspektrometrie gemessen. Es wurden zwei transgene Mäuselinien ausgewählt. Die 5xFAD-Mäuselinie besitzt fünf familiäre Alzheimer-Mutationen, von denen drei im APP-Gen und zwei im PSEN-1-Gen liegen, die zu einer Überexpression von APP und zu einer Bildung von Aβ-Plaques führen. Die Tau-P301L-Mäuselinie, deren Mutation im MAPT-Gen liegt, bildet hingegen Tau-Aggregate. Nach einer dreiwöchigen <sup>13</sup>C-Lysin-Fütterung und anschließender Fixierung mit Paraformaldehyd wurden Gehirnschnitte der Mäuse angefertigt, die mit einem spezifischen Antikörper gegen Aß bzw. Tau angefärbt wurden. Aus jedem Präparat wurden Fluoreszenz- und dazugehörige NanoSIMS-Bilder erstellt. Die Fluoreszenzbilder wurden dahingehend bearbeitet, dass sie exakt an die NanoSIMS-Bilder angepasst wurden. Für die Analyse wurden in den Fluoreszenzbildern – Autofluoreszenzbild und Fluoreszenzbild mit spezifischer Antikörperfärbung - in definierten Bereichen Markierungen gesetzt. Beide Fluoreszenzbilder zeigten Signale (Abbildung 13 in Abschnitt 2.4). Bereiche, in denen sich die Signale beider Fluoreszenzbilder überlappten, wurden als Aggregat definiert. Bereiche, die nur in der Antikörperfärbung sichtbar waren, wurden als Nicht-Aggregat betitelt. Areale, die nur im Autofluoreszenzbild auffällig waren, wurden unspezifisches Signal genannt und Bereiche, die in keinem der beiden Fluoreszenzbilder Signale zeigten, wurden als Hintergrund bezeichnet. In diesen vier Bereichen der Fluoreszenzbilder wurden kreisförmige Markierungen gesetzt und anschließend auf die NanoSIMS-Bilder übertragen. Mit den gemessenen Ionenwerten innerhalb der Markierungen konnten die Isotopenverhältnisse <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N, <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S errechnet und anschließend statistisch analysiert werden. Zusätzlich wurden Linescans in den Bereichen Aggregat, Nicht-Aggregat und unspezifisches Signal durchgeführt, um den <sup>13</sup>C-Einbau vom Zentrum des Signals bis in die Peripherie zu untersuchen. Die Linescans wurden ebenfalls in den Fluoreszenzbildern erstellt und dann auf die NanoSIMS-Bilder übertragen. Anschließend wurde das Isotopenverhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N berechnet, um den <sup>13</sup>C-Einbau in neusynthetisierte Proteine zu messen und Unterschiede zwischen zentralem und peripherem Einbau statistisch zu analysieren.

# 3.1 Transgene Mäuselinien für die Erforschung der Pathologien

Für die Erforschung von Alzheimer werden seit 1995 transgene Mäuselinien verwendet (Bryan et al. 2009). Das Genom der Maus ähnelt dem menschlichen Genom in Größe, Struktur und Abschnittszusammensetzung. Über 80% der Mäusegene zeigen eine Homologie zu den menschlichen Genen (Vierstra et al. 2014). Da Mäuse nicht an Alzheimer erkranken, wurden transgene Mäuselinien entwickelt, um Aspekte der Alzheimerpathologie zu erforschen (Esquerda-Canals et al. 2017). Für der Untersuchung des Aggregat-Metabolismus wurden die bekannten Mäuselinien 5xFAD und Tau-P301L ausgewählt. Die 5xFAD-Mäuselinie besitzt mehrere Mutationen in zwei Transgenen. Die Tau-P301L-Mäuselinie weist eine Mutation in einem Transgen auf. Jedes Transgen wird durch einen Vektor in die Maus eingebracht. Im Vektor befindet sich ebenfalls der Thy-1-Promoter, der neuronspezifisch ist und zu einer verstärkten Expression der nachgeschalteten Gene führt (Caroni 1997).

### 3.1.1 5xFAD-Mäuselinie

Die 5xFAD-Mäuselinie besitzt fünf familiäre Mutationen, von denen drei im APP-Gen (K670N/M671L, I716Vund V717I) und zwei im PSEN-1-Gen (M146L und L286V) lokalisiert sind (Abbildung 15). Die transgenen Mäuse entstehen durch die Koinjektion zweier Vektoren, von denen ein Vektor das APP-Transgen und der andere Vektor das PSEN-1-Transgen beinhaltet. Die schwedische Doppelmutation K670N/M671L erhöht die gesamte Aβ-Konzentration und zeigt eine siebenfache Überexpression des transgenen APPs (Sturchler-Pierrat et al. 1997). Die vier anderen Mutationen beeinflussen das Verhältnis von Aβ-42 zu Aβ-40. Die Florida-Mutation I716V führt zu einem zweifach gesteigerten Verhältnis von Aβ-42 (43) zu A $\beta$ -40 (Eckman et al. 1997). Die Produktion von A $\beta$ -42 wird ebenfalls in der London-Mutation V717I, in der PSEN-1-Mutation M146L und in der PSEN-1-Mutation L286V erhöht. Die PSEN-1-Mutation L286V zeigt zusätzlich eine absteigende Aβ-40-Konzentration (Sun et al. 2017). Es wird diskutiert, ob die Konzentrationen von Aβ-40 und Aβ-38 in der-Mutation M146L steigen oder unverändert bleiben (Sun et al. 2017; Liu et al. 2014). Insgesamt zeigt sich bei der Kombination der Mutationen eine 1,5-fache Überexpression vom humanen APP, eine 1,8-fache Überexpression von PSEN-1 und ein erhöhtes Verhältnis von Aβ-42/Aβ-40 (Sadleir et al. 2018).

Bereits ab zwei Monaten sind Amyloid-Ablagerungen nachweisbar. Die punktförmigen Aβ-Akkumulationen bilden sich vornehmlich somato-dendritisch und in der Nähe vom Axonhügel in sauren Kompartimenten wie multivesikulären Körpern und Endosomen (Oakley et al. 2006). Durch das große Verhältnis von Aβ-42 und Aβ-40 sind die Plaques bei 5xFAD-Mäusen kleiner, zahlreicher und dichter gepackt als im menschlichem Gehirnschnitten, die größere Plaques aufweisen (Oakley et al. 2006). Die 5xFAD-Mäuse weisen die für Alzheimer typischen Merkmale Neuronenverlust, Amyloidplaques mit β-Faltblattstruktur, Gliosis und Gedächtnisverlust auf (Oakley et al. 2006). Weibliche Mäuse zeigen eine aggressive Plaquepathologie und erreichen erst vier Monate später als die männlichen Mäuse ein Plaqueplateau (Bhattacharya et al. 2014). Gegensätzlich zum menschlichen Gehirn zeigen die 5xFAD-Mäuse jedoch keine Tauphosphorylierung (Oakley et al. 2006).



Abbildung 15: Schema 5xFAD-Transgene mit Thy-1-APP und Thy-1-PSEN-1; schwarze Pfeile lokalisieren Mutationen im *APP*-Gen bzw. *PSEN-1*-Gen. Abbildung basierend auf der Abbildung 1A von Oakley et al. (2006)

#### 3.1.2 Tau-P301L-Mäuselinie

Die transgene Tau-P301L-Mäuselinie trägt die P301L-Mutation im MAPT-Gen (Abbildung 16). Diese Mutation ist nicht kennzeichnend für die Alzheimerkrankheit. Sie wird eher mit der Tauopathie bei der frontotemporalen Demenz und bei der Parkinson-Krankheit assoziiert (Lewis et al. 2000). Dennoch wird die Tau-P301L-Mutation auch in der Alzheimerforschung genutzt, um die Tau-Pathologie zu erforschen (Shin et al. 2020). Die Missense-Mutation, die zu einem Einbau von Leucin anstelle von Prolin führt, tritt im Exon 10 auf (Dumanchin et al. 1998). Durch die Mutation wird das 3R/4R-Verhältnis verändert und die Isoform 2N4R überexprimiert (Hutton et al. 1998). Es zeigt sich eine zweifache Überexpression vom Protein Tau innerhalb der Mäuselinie (Terwel et al. 2005). Die 4R-Isoform zeigt eine geringere Bindungsaffinität zu den Mikrotubuli als die 3R-Isoform (Terwel et al. 2005). Die Tau-P301L-Mutation fördert die Bildung von β-Faltblattstrukturen und beschleunigt die Bildung von Tau-Neurofibrillen (Von Bergen et al. 2001). Ab dem dritten Monat zeigen sich erste Tau-Pathologien, die ab dem sechsten Monat unlösliche Aggregate ausbilden (Terwel et al. 2005). Die Tau-Neurofibrillen scheinen sich nur in ihrer Größe von den Tau-Neurofibrillen im menschlichen Gehirn zu unterscheiden (Terwel et al. 2005). Insgesamt bildet die P301L-Maus viele kleine intrazelluläre Tau-Aggregate, die sich somato-dendritisch anlagern (Terwel et al. 2005). Bei älteren Mäusen zeigen sich leichte Motorprobleme, altersabhängige kognitive Defizite und eine stärkere Tau-Phosphorylierung (Terwel et al. 2005). Im Vergleich zu anderen Mäuselinien mit Tauopathie scheint die Tau-P301L-Maus eine geringere Hyperphosphorylierung aufzuweisen (Terwel et al. 2005). Es kommt zu einer Neurodegenration und zu einer Astrogliosis, einem Anstieg der Astrozytenkonzentrationen durch die Destruktion von Nerven, ab dem siebtem Monat (Terwel et al. 2005). Die Lebenserwartung der Mäuse liegt bei maximal 12 Monaten (Terwel et al. 2005).



Abbildung 16: Schema Tau-P301L-Transgen mit Thy-1-Tau; schwarzer Pfeil zeigt Mutation im *MAPT*-Gen. Abbildung basierend auf der Abbildung 1B von Shin et al. (2020)

# 3.2 Untersuchung der ROIs mithilfe verschiedener Isotopenverhältnisse in der 5xFAD-Mäuselinie

Es wurden insgesamt sieben Präparate der transgenen Mäuselinie 5xFAD untersucht. Für die Bildanalyse wurden 31 Markierungen als Nicht-Aggregat, 84 Markierungen als Aggregat, 17 Markierungen als unspezifisches Signal und 78 Markierungen als Hintergrund in den Fluoreszenzbildern gesetzt, auf die NanoSIMS-Bilder übertragen und die Unterschiede in den Isotopenverhältnissen <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N, <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S betrachtet. Als deskriptive Angaben werden in den folgenden Abschnitten der Mittelwert (M) und der Standardfehler (SE) angegeben. Der Mittelwert beschreibt den statistischen Durchschnittswert, für den alle Werte einer Stichprobe addiert und die Summe durch die Anzahl der Werte dividiert wird. Der Standardfehler ist ein statistisches Maß, welches die Abweichung des Mittelwerts einer Stichprobe vom wahren Mittelwert der Grundgesamtheit darstellt. Es wurden Kastengrafiken genutzt, um die Verteilung der Stichproben der definierten Bereiche Aggregat, Nicht-Aggregat und Hintergrund sowie ihre signifikanten Unterschiede zu veranschaulichen. Die Kastengrafik besteht aus einem Kasten und zwei Whiskern. Die Stichprobe wird in Quartile (Viertel) eingeteilt. Der Median entspricht dem zweiten Quartil, da er die Daten in Hälften einteilt. Das erste Quartil, auch unteres Quartil genannt und das dritte oder obere Quartil bilden die Mediane der beiden Datenhälften des Medians. Mindestens 25% der Stichprobenwerte sind kleiner-gleich dem ersten Quartil und höchstens 75% sind größer als das untere Quartil. Dementsprechend sind maximal 25% der Werte einer Stichprobe größer als das dritte Quartil und mindestens 75% der Werte kleiner-gleich dem oberen Quartil. Der Abstand zwischen dem ersten und dritten Quartil wird Interquartilabstand (IQR) genannt und schließt 50% der Stichprobendaten ein.

In der Grafik wurde der Kasten, der den Mittelwert und die mittleren 50% der Werte der Stichprobe enthält, aus dem ersten und dritten Quartil gebildet. Die Whisker schlossen sich oberhalb bzw. unterhalb des Kastens an. Sie umfassten die Werte der Stichprobe, die unterhalb des ersten Quartils bzw. oberhalb des dritten Quartils vorkommen und maximal einen 1,5-fachen Interquartilabstand aufwiesen. Ausreißerpunkte, die abseits des 1,5-fachen Interquartilabstands liegen, wurden nicht dargestellt. Auch auf die Darstellung der Mediane wurde aufgrund der Übersichtlichkeit verzichtet.

### 3.2.1 Untersuchung der Proteindynamik mit <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in der 5xFAD-Mäuselinie

Mit dem Verhältnis von <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N sollte der Einbau des stabilen Isotops <sup>13</sup>C in neue Proteine untersucht werden. Der Einbau von <sup>13</sup>C, welches physiologisch zu 1,05% vorkommt, wurde anschließend zwischen den Bereichen verglichen. Abbildung 17 veranschaulicht den Einbau von <sup>13</sup>C in die drei definierten Bereiche und zeigt, dass in jedem Bereich die Inkorporation erfolgte, auch wenn sich im Einbau Unterschiede zeigten. Um die Unterschiede auf ihre Signifikanz zu untersuchen, wurden statistische Tests durchgeführt. Da für die Wahl eines Statistiktests entscheidend ist, ob eine Normalverteilung der Stichproben vorliegt, wurde zunächst die Normalverteilung getestet. Nur die Stichprobe der Aggregate (W = 0.971; p = 0.055) war nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Bei den Stichproben von Nicht-Aggregat (W = 0.918; p = 0,021), unspezifischem Signal (W = 0,775; p < 0,001) und Hintergrund (W = 0,956; p = 0,009) musste die Annahme einer Normalverteilung verworfen werden. Deshalb wurden die statistischen Analysen mit dem Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Aggregate (M 2,603% ± SE 0,076%) zeigten den geringsten Einbau von <sup>13</sup>C-Lysin. Die Nicht-Aggregate (M 4,755% ± SE 0,178%) wiesen den höchsten Einbau auf. Der Unterschied zwischen Aggregat und Nicht-Aggregat war hochsignifikant (p < 0,001) Die Bereiche Hintergrund (M 3,866%  $\pm$  SE 0,143%) und unspezifisches Signal (M 3,755%  $\pm$  SE 0,598%) zeigten bezüglich ihres Mittelwertes einen ähnlichen Einbau des Isotops. Die unspezifischen Signale (IQR = 4,89%) wiesen jedoch einen größeren Interquartilabstand auf als der Hintergrund (IQR = 1,728%). Ein großer IQR deutet auf weit auseinanderliegende Daten hin. Zudem wurde kein signifikanter Unterschied im 13C-Einbau zwischen dem Bereich unspezifisches Signal und den anderen Bereichen Nicht-Aggregat (p = 0,444), Aggregat (p = 0,727) und Hintergrund (p = 0,716) erkennbar. Der Bereich Hintergrund hingegen zeigte einerseits einen hochsignifikant stärkeren Einbau von <sup>13</sup>C als der Bereich Aggregat (p < 0,001) und andererseits einen hochsignifikant geringeren Einbau als der Bereich Nicht-Aggregat (p < 0.001).

Die Ergebnisse implizieren, dass die Aggregate eine größere Stabilität als die Umgebung aufweisen und dennoch eine Dynamik zeigen. Die stärkere Dynamik bei den Nicht-Aggregaten ist wahrscheinlich durch eine Überexprimierung der Proteine bedingt.



Abbildung 17: 5xFAD-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N von drei definierten Bereichen Nicht-Aggregat (rot), Aggregat (blau) und Hintergrund (gelb) in Abhängigkeit der Konzentration in Prozent; Signifikanz durch Sternchen dargestellt: \*\*\*hochsignifikanter Unterschied (p < 0,001); Kastengrafik: x entspricht Mittelpunkt, untere Kastenbegrenzung ist 1. Quartil, 3. Quartil entspricht oberer Kastenbegrenzung, Whisker (schwarz) entspricht maximal einem 1,5-fachen Interquartilabstand

## 3.2.2 Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in der 5xFAD-Mäuselinie

Der Phosphoreinbau in die Proteine wurde mit dem Verhältnis <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N bestimmt. Es zeigte sich in allen Bereichen ein geringer Phosphoreinbau (Abbildung 18). Die Annahme einer Normalverteilung der Stichproben konnte bei allen Bereichen – Aggregat (W = 0,847; p < 0,001), Nicht-Aggregat (W = 0,782; p < 0,001), unspezifisches Signal (W = 0,879; p = 0,031) und Hintergrund (W = 0,876; p < 0,001) – verworfen werden. Tendenziell wiesen die Aggregate (M 0,574% ± SE 0,049%) den höchsten Phosphoreinbau auf, zeigten jedoch nur im Vergleich mit dem unspezifischen Signal einen signifikanten Unterschied (p = 0,024). Das unspezifische Signal (M 0,215% ± SE 0,031%) wies außerdem im Vergleich zum Nicht-Aggregat (p = 0,002)

und Hintergrund (p = 0,009) einen sehr signifikant geringeren Einbau von Phosphor auf. Die Bereiche Hintergrund (M 0,493%  $\pm$  SE 0,045%) und Nicht-Aggregat (M 0,439%  $\pm$  SE 0,06%) ähnelten sich in ihrem Phosphoreinbau. Zwischen den beiden Bereichen wurde kein signifikanter Unterschied deutlich (p = 0,846). Auch wenn die Aggregate den größten Phosphoreinbau aufwiesen, zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Nicht-Aggregaten (p = 0,639) und zum Hintergrund (p = 0,222).



Abbildung 18: 5xFAD-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N von drei definierten Bereichen Nicht-Aggregat (rot), Aggregat (blau) und Hintergrund (gelb) in Abhängigkeit der Konzentration in Prozent; Kastengrafik: x entspricht Mittelpunkt, untere Kastenbegrenzung ist 1. Quartil, 3. Quartil entspricht oberer Kastenbegrenzung, Whisker (schwarz) entspricht maximal einem 1,5-fachen Interquartilabstand

## 3.2.3 Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S in der 5xFAD-Mäuselinie



Abbildung 19: 5xFAD-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S von drei definierten Bereichen Nicht-Aggregat (rot), Aggregat (blau) und Hintergrund (gelb) in Abhängigkeit der Konzentration in Prozent; Kastengrafik: x entspricht Mittelpunkt, untere Kastenbegrenzung ist 1. Quartil, 3. Quartil entspricht oberer Kastenbegrenzung, Whisker (schwarz) entspricht maximal einem 1,5-fachen Interquartilabstand

40

Eine andere Möglichkeit für die Proteinquantifikation und für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrads ist die Errechnung des Phosphor-Schwefel-Verhältnisses. Wie im Verhältnis <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N wurde ein geringer Phosphoreinbau deutlich (Abbildung 19). In allen Bereichen konnte die Normalverteilung verworfen werden – Aggregat (W = 0,845; p < 0,001), Nicht-Aggregat (W = 0,735; p < 0,001), unspezifisches Signal (W = 0,822; p = 0,004) und Hintergrund (W = 0,726; p < 0,001). Den höchsten Einbau zeigte der Bereich Hintergrund (M 0,115% ± SE 0,013%). Eine etwas geringere Inkorporation wiesen die Bereiche Aggregat (M 0,102% ± SE 0,009%) und Nicht-Aggregat (M 0,098% ± SE 0,016%) auf. Das unspezifische Signal (M 0,075% ± SE 0,012%) baute am wenigsten Phosphor ein. Die statistische Untersuchung mit dem Mann-Whitney-U-Test konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bereichen nachweisen. Dementsprechend zeigte der Bereich Aggregat nicht signifikante Unterschiede zum Nicht-Aggregat (p = 0,72), unspezifischen Signal (p = 0,105) und Hintergrund (p = 0,619). Weiterhin zeigten sich keine Signifikanzen zwischen Nicht-Aggregat und Hintergrund (p = 0,723), Nicht-Aggregat und unspezifischem Signal (p = 0,491) sowie unspezifischem Signal und Hintergrund (p = 0,084).

Im Vergleich zu <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N zeigen die Ergebnisse, dass der Hintergrund am stärksten phosphoryliert ist. Dementsprechend verhalten sich die Ergebnisse von <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S nicht vollständig kongruent zueinander und zeigen keine hyperphosphorylierten Aggregate.

# 3.3 Untersuchung der ROIs mithilfe verschiedener Isotopenverhältnisse in der Tau-P301L-Mäuselinie

Aus den transgenen Mäusen, die die Tau-P301L- Mutation in sich tragen, entstanden 18 Präparate. Die Bildbearbeitung und -analyse wurden nach den gleichen Kriterien durchgeführt, die auch bei den 5xFAD-Mäusen verwendet wurden. Insgesamt wurden in den Fluoreszenzbildern 203 Markierungen für den Bereich Aggregat, 219 Markierungen für den Bereich Nicht-Aggregat, 59 Markierungen für den Bereich unspezifisches Signal und 179 Markierungen für den Hintergrund gesetzt. Die Markierungen wurden auf die NanoSIMS-Bilder übertragen. Mithilfe der statistischen Analyse sollten die errechneten Isotopenverhältnissen <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N, <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S Aufschluss über den Metabolismus der Tau-Aggregate geben. Die Ergebnisse für die Bereiche Aggregat, Nicht-Aggregat und Hintergrund wurden ebenfalls mit Kastengrafiken visualisiert.

# 3.3.1 Untersuchung der Proteindynamik mit <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in der Tau-P301L-Mäuselinie

Um den <sup>13</sup>C-Einbau in neue Proteine zu untersuchen, wurde für die Tau-P301L-Mäuselinie ebenfalls das Isotopenverhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N gebildet. Der isotopische Einbau war in der Verteilung der Inkorporation mit den 5xFAD-Mäusen vergleichbar. Die Aggregate (M 2,347%  $\pm$  SE 0,05%) besaßen den geringsten und die Nicht-Aggregate (M 3,809%  $\pm$  SE 0,057%) den stärksten <sup>13</sup>C-Einbau (Abbildung 20). Das unspezifische Signal (M 3,342%  $\pm$  SE 0,124%) und der Hintergrund (M 3,51%  $\pm$  SE 0,079%) wiesen ebenfalls einen ähnlichen Einbau auf.



Abbildung 20: Tau-P301L-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses  ${}^{13}C^{14}N/{}^{12}C^{14}N$  von drei definierten Bereichen Nicht-Aggregat (rot), Aggregat (blau) und Hintergrund (gelb) in Abhängigkeit der Konzentration in Prozent; Signifikanz durch Sternchen dargestellt: \*\*\*hochsignifikanter Unterschied (p < 0,001); Kastengrafik: x entspricht Mittelpunkt, untere Kastenbegrenzung ist 1. Quartil, 3. Quartil entspricht oberer Kastenbegrenzung, Whisker (schwarz) entspricht maximal einem 1,5-fachen Interquartilabstand

Eine Abweichung zu den 5xFAD-Mäusen zeigte sich in der Streuung der Stichprobe des unspezifischen Signals. Im Gegensatz zu den 5xFAD-Mäusen wiesen Hintergrund und unspezifisches Signal eine ähnliche Streuung auf. Ein weiterer Unterschied zu den 5xFAD-Mäusen zeigte sich beim Test auf Normalverteilung. Bei den Tau-P301L-Mäusen konnte sowohl bei den Nicht-Aggregaten (W = 0,989; p = 0,108) als auch bei den unspezifischen Signalen (W = 0,978; p = 0,365) eine Normalverteilung angenommen werden. Da in den Bereichen Aggregat (W = 0,903; p < 0,001) und Hintergrund (W = 0,91; p < 0,001) jedoch keine Normalverteilung festgestellt werden konnte, wurden alle Bereiche mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aggregate ein hochsignifikant geringeren Isotopeneinbau als die anderen untersuchten Bereiche – Nicht-Aggregat (p < 0,001), unspezifisches Signal (p < 0,001) und Hintergrund (p < 0,001) – besaßen. Des Weiteren zeigten die Nicht-Aggregate eine hochsignifikant stärkere <sup>13</sup>C-Inkorporation als die Bereiche unspezifisches Signal (p < 0,001) und Hintergrund (p < 0,001). Die deskriptiven Angaben der Bereiche Hintergrund und unspezifisches Signal ähnelten sich. Zwischen diesen beiden Bereichen konnte kein signifikanter Unterschied (p = 0,567) festgestellt werden.

Die Ergebnisse entsprechen größtenteils den Ergebnissen der 5xFAD-Mäuselinie. Die einzige Unterscheidung besteht bei den Signifikanzen zwischen dem unspezifischen Signal und den Aggregaten bzw. Nicht-Aggregaten.

# 3.3.2 Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in der Tau-P301L-Mäuselinie



Abbildung 21: Tau-P301L-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N von drei definierten Bereichen Nicht-Aggregat (rot), Aggregat (blau) und Hintergrund (gelb) in Abhängigkeit der Konzentration in Prozent; Signifikanz durch Sternchen dargestellt: \*\*sehr signifikanter Unterschied (p < 0,01); Kastengrafik: x entspricht Mittelpunkt, untere Kastenbegrenzung ist 1. Quartil, 3. Quartil entspricht oberer Kastenbegrenzung, Whisker (schwarz) entspricht maximal einem 1,5-fachen Interquartilabstand

Der Phosphoreinbau in den untersuchten Bereichen war wie bei den 5xFAD-Präparaten gering. Es zeigte sich jedoch eine andere Verteilung des Phosphoreinbaus in die Bereiche (Abbildung 21). Den stärksten Phosphoreinbau besaßen die Nicht-Aggregate (M 0,602%  $\pm$  SE 0,06%) gefolgt vom Hintergrund (M 0,488%  $\pm$  SE 0,054%) und vom unspezifischen Signal (M 0,4%  $\pm$  SE 0,037%). In den Aggregaten (M 0,368%  $\pm$  SE 0,021%) zeigte sich tendenziell der geringste Phosphoreinbau. Die Normalverteilung der Stichproben wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. In allen Bereichen – Aggregat (W = 0,762; p < 0,001), Nicht-Aggregat (W = 0,532; p < 0,001), unspezifisches Signal (W = 0,893; p < 0,001) und Hintergrund (W = 0,53; p < 0,001) – musste die Annahme einer Normalverteilung verworfen werden. Der Vergleich der Bereiche wurde mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die einzigen sehr signifikanten Unterschiede fanden sich zwischen Nicht-Aggregat und Aggregat (p = 0,007) bzw. zwischen Nicht-Aggregat und Hintergrund (p = 0,003). Der Bereich Nicht-Aggregat hatte einen signifikant höheren Phosphoreinbau als die beiden anderen Bereiche. Die Unterschiede zwischen dem Bereich unspezifisches Signal und den anderen Bereichen waren nicht signifikant – Nicht-Aggregat (p = 0,333), Aggregat (p = 0,597) und Hintergrund (p = 0,301). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Bereichen Aggregat und Hintergrund (p = 0,239).

Die Resultate implizieren, dass der Phosphoreinbau in allen Bereichen gering ausfällt. Eine Tendenz ist dahingehend festzustellen, dass die Aggregate weniger Phosphor als die umgebenden Bereiche besitzen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die transgenen Mäuselinien 5xFAD und Tau-P301L in ihrem Phosphoreinbau unterscheiden.

# 3.3.3 Untersuchung der Proteinphosphorylierung mit <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S in der Tau-P301L-Mäuselinie



Abbildung 22: Tau-P301L-Mäuselinie Bestimmung des Ionenverhältnisses <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S von drei definierten Bereichen Nicht-Aggregat (rot), Aggregat (blau) und Hintergrund (gelb) in Abhängigkeit der Konzentration in Prozent; Signifikanz durch Sternchen dargestellt: \*\*sehr signifikanter Unterschied (p < 0,01), \*\*\*hochsignifikanter Unterschied (p < 0,001); Kastengrafik: x entspricht Mittelpunkt, untere Kastenbegrenzung ist 1. Quartil, 3. Quartil entspricht oberer Kastenbegrenzung, Whisker (schwarz) entspricht maximal einem 1,5-fachen Interquartilabstand

Das Verhältnis <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S war in allen Bereichen gering (Abbildung 22). Die Bereiche Nicht-Aggregat (M 0,125%  $\pm$  SE 0,009%) und Hintergrund (M 0,113%  $\pm$  SE 0,01%) wiesen ein ähnliches Verhältnis auf. Ein geringeres Verhältnis zeigten Aggregat (M 0,061%  $\pm$  SE 0,005%) und unspezifisches Signal (M 0,097%  $\pm$  SE 0,011%). Nach der Durchführung des Shapiro-WilkTests wurde die Annahme einer Normalverteilung in allen Bereichen verworfen – Aggregat (W = 0,7; p < 0,001), Nicht-Aggregat (W = 0,707; p < 0,001), unspezifisches Signal (W = 0,828; p < 0,001) und Hintergrund (W = 0,69; p < 0,001). Der Mann-Whitney-U-Test unterstützte die Annahme, dass die Aggregate den geringsten Phosphoreinbau aufwiesen. Es konnten hochsignifikante Unterschiede zwischen Aggregat und Nicht-Aggregat (p < 0,001), Aggregat und unspezifischem Signal (p < 0,001) sowie zwischen Aggregat und Hintergrund (p < 0,001) festgestellt werden. Darüber hinaus wurde ein sehr signifikanter Unterschied zwischen den Bereichen Nicht-Aggregat (p = 0,238) sowie unspezifischem Signal und Hintergrund (p = 0,746) konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

Zusammenfassend treten Unterschiede zwischen den Ergebnissen <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S und <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N hervor. Dennoch kann keine Hyperphosphorylierung der Tau-P301L-Aggregate festgestellt werden.

# 3.4 Untersuchung der Proteindynamik mit Linescans vom Zentrum des Signals bis zur Peripherie in der 5xFAD-Mäuselinie

Nachdem der isotopische Einbau in den vier Bereichen analysiert wurde, wurden Linescans durchgeführt. Für die Linescans wurden die Bereiche ausgewählt, die im Autofluoreszenzbild und/oder im Fluoreszenzbild mit spezifischer Antikörperfärbung Signale aufwiesen. Dementsprechend wurden die Bereiche Aggregat, Nicht-Aggregat und unspezifisches Signal untersucht. Wie in den Abschnitten 3.2.1 und 3.3.1 beschrieben, wiesen alle untersuchten Bereiche eine <sup>13</sup>C-Inkorporation auf. Die kreisförmigen Markierungen wurden zwar für die jeweiligen Bereiche nur innerhalb der Signale gesetzt, allerdings wurden sowohl zentrale als auch etwas peripher im Signal liegende Markierungen gesetzt und ein gemeinsamer Mittelwert sowie Standardfehler ermittelt. Somit konnte zunächst festgestellt werden, dass eine verstärkte <sup>13</sup>C-Inkorporation in den Bereichen vorlag. Um die Theorien über den Metabolismus der Plaques (Abschnitt 1.2.4) zu überprüfen, wurden Linescans vom Zentrum des Signals bis in die Peripherie durchgeführt. Die Verläufe der Linescans sollten mögliche Unterschiede im <sup>13</sup>C-Einbau des Zentrums und der Peripherie aufzeigen. Weil der <sup>13</sup>C-Einbau in neue Proteine bestimmt werden sollte, wurde ebenfalls das Isotopenverhältnis 13C14N/12C14N bestimmt. Anschließend wurden die Linescans mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test und dem anschließenden Posthoc-Test nach Tukey statistisch analysiert.

Es wurden insgesamt 13 Linescans bei den Aggregaten, 5 Linescans bei den Nicht-Aggregaten und 4 Linescans für das unspezifische Signal in den 5xFAD-Präparaten untersucht (Abbildung 23). Wie in Abbildung 24 dargestellt, beschreibt der <sup>13</sup>C-Einbau in den Aggregaten einen sigmoidalen Verlauf mit einem geringen Einbau im Zentrum und einem stärkeren Einbau in der Peripherie. Der geringste Einbau konnte im Zentrum (M 1,765%  $\pm$  SE 0,055%) festgestellt werden. Der stärkste Einbau zeigte sich 0,735 µm vom Zentrum (M 3,663%  $\pm$  SE 0,183%) entfernt. Der Kruskal-Wallis-Test stellte einen signifikanten Unterschied zwischen Zentrum und Peripherie fest, der mit dem Posthoc-Test nach Tukey unterstützt wurde. Der Test nach Tukey wies signifikante Unterschiede zwischen Zentrum und Peripherie ab 0,525 µm Entfernung vom Zentrum nach.



Abbildung 23: Linescans der 5xFAD-Mäuselinie einzeln dargestellt vom Zentrum bis Peripherie in μm in Abhängigkeit vom Ionenverhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in Prozent A) Datenreihen 1 bis 13 der Aggregate B) Datenreihen 1 bis 5 der Nicht-Aggregate

Die Linescans der Nicht-Aggregate stellten ebenfalls einen sigmoidalen Verlauf dar, der jedoch gegenläufig zu den Linescans der Aggregate war. Im Zentrum des Signals

(M 4,818%  $\pm$  SE 0,735%) zeigte sich die stärkste <sup>13</sup>C-Inkorporation, die sich in der Peripherie verringerte und den wenigsten <sup>13</sup>C-Einbau in der Peripherie mit 1,155 µm Entfernung vom Zentrum (M 2,291%  $\pm$  SE 0,642%) aufwies. Der Kruskal-Wallis-Test ermittelte einen möglichen Unterschied zwischen dem isotopischen Einbau des Zentrums und der Peripherie, der sich jedoch im Posthoc-Test nicht bestätigte.



Abbildung 24: Linescans 5xFAD-Mäuselinie vom Zentrum bis Peripherie in  $\mu$ m in Abhängigkeit vom Ionenverhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in Prozent; A) Aggregat blaue Linie durch Mittelwerte (M), Standardfehler (SE) als blaue Fehlerbalken; B) Nicht-Aggregat rote Linie durch M, SE als rote Fehlerbalken; Signifikanz durch Sternchen dargestellt: \*signifikanter Unterschied (p < 0,05)

Aus den Linescans der unspezifischen Signale sind keine Tendenzen für einen veränderten Einbau vom Zentrum in die Peripherie abzulesen. Der isotopische Einbau scheint vom Zentrum (M 3,966%  $\pm$  SE 1,598%) bis zur Peripherie (M 3,488%  $\pm$  SE 0,453%) mit einer Entfernung von 1,155 µm zum Zentrum gleichmäßig zu sein. Auch der Kruskal-Wallis-Test konnte keine signifikanten Unterschiede feststellen. Es zeigte sich lediglich eine stärkere Streuung der Werte innerhalb und in der Nähe zum Zentrum im Vergleich zu den Linescans der Aggregate und Nicht-Aggregate.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Beobachtungen der Linescans mit den Ergebnissen aus dem Abschnitt 3.2.1 kongruent sind. Der Bereich Aggregat und das Zentrum der Aggregat-Linescans zeigten den geringsten <sup>13</sup>C-Einbau, wohingegen die Markierungen und zentralen Bereiche der Nicht-Aggregat-Linescans den stärksten Isotopeneinbau aufwiesen. Sowohl in den Markierungen als auch in den Linescans der unspezifischen Signale zeigte sich ein <sup>13</sup>C-Einbau, der zwischen dem Einbau der Aggregate und dem der Nicht-Aggregate lag. Außerdem spiegelten sich in den Linescans des unspezifischen Signals die Variabilität der Messdaten wider, die bereits bei der Analyse der Bereiche deutlich wurde. Bezogen auf die Fragestellung, kann sowohl eine strukturelle Stabilität im Zentrum der Aggregate als auch eine Dynamik in der Peripherie der Aggregate gezeigt werden. Dementsprechend können die Aggregate als metastabil bezeichnet werden.

# 3.5 Untersuchung der Proteindynamik mit Linescans vom Zentrum des Signals bis zur Peripherie in der Tau-P301L-Mäuselinie

Die Linescans der Mäuselinie Tau-P301L wurden in der gleichen Weise erstellt und analysiert, wie es bei der anderen transgenen Mäuselinie in Abschnitt 3.4 beschrieben wurde. Insgesamt wurden 35 Linescans für die Aggregate, 4 Linescans für die Nicht-Aggregate und 6 Linescans für die unspezifischen Signale mit dem Isotopenverhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N untersucht (Abbildung 25).

Die Aggregate (M 2,046%  $\pm$  SE 0,128%) zeigten im Zentrum den geringsten <sup>13</sup>C-Einbau. Der Einbau verstärkte sich signifikant in Richtung Peripherie (Abbildung 26). Der höchste Einbau zeigte sich 1,05 µm vom Zentrum (M 3,486%  $\pm$  SE 0,267%) entfernt. Der Anstieg wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert, der einen Unterschied zwischen Zentrum und Peripherie andeutete. Mit dem nachfolgenden Posthoc-Test nach Tukey konnten signifikante Unterschiede zwischen dem Zentrum und der Peripherie ab 0,42 µm Entfernung vom Zentrum ermittelt werden. Die Resultate zeigten damit eine Ähnlichkeit zu den Ergebnissen der 5xFAD-Aggregate. Die Tau-P301L-Linescans hingegen wiesen im Zentrum eine größere Streuung der Werte auf.

Wie bei den 5xFAD-Linescans zeigten die Nicht-Aggregate der Tau-P301L-Maus im Zentrum des Signals (M 4,112%  $\pm$  SE 0,34%) den höchsten Einbau von <sup>13</sup>C. Eine abfallende Tendenz in Richtung der Peripherie war erkennbar. Der geringste Isotopeneinbau zeigte sich 0,735 µm vom Zentrum entfernt (M 3,323%  $\pm$  SE 0,494%). Ausgenommen davon war der am weitesten in der

Peripherie liegende Wert, da dieser nur durch den Linescan 3 (Abbildung 25D) gebildet wird und daher kein SE errechnet werden konnte. Der Kruskal-Wallis-Test konnte keinen möglichen signifikanten Unterschied zwischen Zentrum und Peripherie aufzeigen, sodass die grafische Beschreibung mit der abfallenden Tendenz vom Zentrum zur Peripherie bestätigt werden kann.





Abbildung 25: Linescans der Tau-P301L-Mäuselinie einzeln dargestellt vom Zentrum bis Peripherie in  $\mu$ m in Abhängigkeit vom Ionenverhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in Prozent A) Datenreihen 1 bis 11 der Aggregate B) Datenreihen 12 bis 23 der Aggregate C) Datenreihen 24 bis 35 der Aggregate D) Datenreihen 1 bis 4 der Nicht-Aggregate

In den Linescans der unspezifischen Signale wurde ebenfalls eine leicht abfallende Tendenz ersichtlich, die durch den Kruskal-Wallis-Test als nicht signifikant eingestuft wurde. Das Zentrum des unspezifischen Signals (M 3,383%  $\pm$  SE 0,881%) zeigte einen höheren Einbau von <sup>13</sup>C im Vergleich zur Peripherie bei 1,05 µm (M 1,997%  $\pm$  SE 0,41%). Wie bei den Linescans der 5xFAD-Mäuse wies das Zentrum eine leicht stärkere Streuung der Werte als die Peripherie auf.

Zusammenfassend reflektieren die Linescans die Untersuchung der Tau-P301L-Bereiche (Abschnitt 3.3.1). Im Vergleich zu den 5xFAD-Mäusen zeigen sich bei den Aggregaten und Nicht-Aggregaten eine stärkere Variabilität in den Verhältnissen. Ansonsten implizieren die Ergebnisse metastabile Aggregate, da sowohl eine gewisse Stabilität im Zentrum als auch eine Dynamik in der Peripherie nachgewiesen wurde.



Abbildung 26: Linescans Tau-P301L-Mäuselinie vom Zentrum bis Peripherie in  $\mu$ m in Abhängigkeit vom Ionenverhältnis <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N in Prozent; A) Aggregat blaue Linie durch Mittelwerte (M), Standardfehler (SE) als blaue Fehlerbalken; B) Nicht-Aggregat rote Linie durch M, SE als rote Fehlerbalken; Signifikanz durch Sternchen dargestellt: \*signifikanter Unterschied (p < 0,05)

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Fluoreszenz- und NanoSIMS-Bilder von transgenen Mäusepräparaten genutzt, um den Metabolismus von Aß-Plaques und Tau-Neurofibrillen zu untersuchen. Die Analyse sollte klären, ob die Aggregate eine strukturelle Stabilität oder eine Dynamik aufweisen und wie sich der Phosphoreinbau in die Aggregate darstellt. Es wurden zwei transgene Mäuselinien ausgewählt, von denen die 5xFAD-Mäuselinie Aβ-Plaques und die Tau-P301L-Mäuslinie Tau-Aggregate ausbildet. Nach einer Fütterung mit <sup>13</sup>C-Lysin wurden Gehirnschnitte angefertigt, die mit einem spezifischen Antikörper gegen Aß oder Tau angefärbt wurden. Aus den Präparaten wurden jeweils zwei Fluoreszenzbilder für die Lokalisation der Aggregate und sieben NanoSIMS-Bilder erstellt. Die NanoSIMS-Technik kann die isotopische Zusammensetzung bestimmen, wodurch Annahmen über den Metabolismus getroffen werden können. Nach der Bearbeitung der Bilder, in der diese exakt verschnitten wurden, konnte der isotopische Einbau analysiert werden. Hierfür wurde der isotopische Einbau von <sup>13</sup>C in die Aggregate bestimmt und mit dem Einbau in die anderen Bereiche - Nicht-Aggregat, unspezifisches Signal und Hintergrund – verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aggregate in der 5xFAD- und Tau-P301L-Mäuselinie einen deutlich geringeren Einbau von <sup>13</sup>C als ihre Umgebung haben. Mit den Linescans wurde die <sup>13</sup>C-Inkorporation vom Zentrum bis in die Peripherie der Signale Aggregat, Nicht-Aggregat und unspezifisches Signal bestimmt. Im Zentrum des Aggregats ist der isotopische Einbau geringer als in den anderen Signalen. In Richtung Peripherie nimmt die Inkorporation hingegen deutlich zu. Die Aggregate zeigen in beiden Mäuselinien einen strukturell stabilen Kern mit einer dynamischen Peripherie. Bezogen auf die Fragestellung implizieren die Resultate weder absolut stabile Plaques noch komplett dynamische Plaques.

Die Inkorporation von Phosphor wurde mit den Verhältnissen <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S überprüft. Die Ergebnisse beider Verhältnisse sind kongruent zueinander und zeigen in den untersuchten Bereichen einen geringen Phosphoreinbau. Allerdings verhielt sich der Phosphoreinbau der Aggregate bei den Mäuselinien gegensätzlich. Im Vergleich zu den anderen Bereichen zeigte sich der Phosphoreinbau in den 5xFAD-Aggregaten tendenziell höher, wohingegen die Tau-P301L-Aggregate den niedrigsten Phosphoreinbau aufwiesen. Die Vermutung, dass die Proteine durch eine Hyperphosphorylierung aggregieren, kann mit diesen Ergebnissen nicht bestätigt werden.

## 4.1 Metastabile Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen

Die Alzheimerkrankheit ist durch die Ansammlung und Aggregation der Proteine Tau und Aβ gekennzeichnet (Alzheimer's association 2018). Die Proteinakkumulationen bilden sich viele Jahre bevor die ersten Symptome auftreten (Alzheimer's association 2018). Seit Jahrzehnten wird an transgenen Mäusen geforscht, um die pathologischen Prozesse zu verstehen (Esquerda-Canals et al. 2017).



Abbildung 27: Plaquewachstum von 6 Monate alten und 10 Monate alten Mäusen in Tagen Abbildung entstammt Yan et al. (2009) aus Journal of Neuroscience. Abbildung wurde vom Autor modifiziert. Copyright 2009 Society of Neuroscience.

Frühere transgene Studien zeigen, dass sich Aβ-Plaques in ihrer Größe und Morphologie nicht mehr verändern, wenn sie sich gebildet haben (Christie et al. 2001; Meyer-Luehmann et al. 2008). Die Entwicklung der Plaques ist abhängig vom Alter der Maus, von der Aβ-Konzentration und von der aktivierten Mikroglia (Meyer-Luehmann et al. 2008; Yan et al. 2009). Es werden Wachstumsraten der Plaques sowohl innerhalb eines Tages als auch innerhalb mehrerer Tage beschrieben (Meyer-Luehmann et al. 2008; Yan et al. 2009; Burgold et al. 2011). In den Studien wurden verschiedene Untersuchungsmethoden genutzt. Die Auswahl der Methodik ist vermutlich den zum Zeitpunkt der jeweiligen Studie existierenden technischen Möglichkeiten geschuldet. Einige Studien nutzten beispielsweise die Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, mit der die Untersuchung einer lebenden Maus über einen bestimmten Zeitraum möglich ist (Burgold et al. 2011; Meyer-Luehmann et al. 2008; Yan et al. 2009). Bei dieser Technik wurde aufgrund der oftmals gleichbleibenden Größe der Plaques auf eine strukturelle Stabilität geschlossen. Andere Studien verwendeten post-mortem Gehirnschnitte mit amyloidfibrillenbindenden Farbstoffen wie Thioflavin, Congored oder konjugierten Polyelektrolyt-Sonden (LCP) (Schmidt et al. 1995; Nilsson et al. 2007). Die LCPs, die flexibler als die anderen Farbstoffe sind, zeigen in dichten Plaques ein unstrukturiertes Zentrum, das von einer strukturierten Peripherie umgeben ist. Nilsson et al. (2007) zeigen, dass sowohl ein Wachstum von innen nach außen als auch ein Wachstum von außen nach innen möglich ist, das mit einer späteren zentralen Umstrukturierung einhergehen könnte. Michno et al. (2021) hingegen vermuten, dass sich zuerst ein stabiler Kern bildet und anschließend die Plaque wächst. Die in der Studie verwendete Technik nutzt ein Sekundärionen-Massenspektrometer (SIMS), um die Inkorporation von stabilen Isotopen (SILK) in die Gehirnschnitte zu untersuchen. Die Inkorporation von stabilen Isotopen, die eine höhere Masse als Deuterium aufweisen, zeigt keine toxischen Effekte für den Organismus (Steinhauser und Lechene 2013). Auch in dieser Arbeit wurde die Inkorporation vom stabilen Isotop <sup>13</sup>C mit der NanoSIMS-Technik analysiert. Hierfür wurden in den beiden transgenen Mäuselinien die vier Bereiche Aggregat, Nicht-Aggregat, unspezifisches Signal und Hintergrund miteinander verglichen. Außerdem wurden Linescans von den Signalen Aggregat, Nicht-Aggregat und unspezifischem Signal erstellt, um mögliche Unterschiede zwischen dem Zentrum des Signals und seiner Peripherie zu zeigen.

Die Aβ-Plaques bildenden 5xFAD-Mäuse zeigen in jedem Bereich eine <sup>13</sup>C-Inkorporation in die Proteine, die über dem physiologischen Verhältnis von 1,05% liegt (Richter et al. 2017). Dementsprechend scheint jeder Bereich eine Dynamik aufzuweisen. Dennoch werden signifikante Unterschiede im <sup>13</sup>C-Einbau zwischen den Bereichen deutlich. Die Aggregate der 5xFAD-Mäuse zeigen einen signifikant geringeren Einbau von 13C als die Bereiche Nicht-Aggregat und Hintergrund. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Aggregate früher als die Nicht-Aggregate gebildet werden und/oder resistenter gegenüber Umwelteinflüssen sind. Die Nicht-Aggregate wurden durch die spezifische Bindung mit dem 6E10-Antikörper angefärbt, der an den A
ß1-16 bindet (Biolegend 2018). Da die Inkorporation bei den Nicht-Aggregaten signifikant höher als im Bereich Hintergrund ist, kann angenommen werden, dass mehr Aβ-Proteine als andere Proteine produziert werden. Dies ist mit der Tatsache übereinstimmend, dass das humane APP-Gen in der Maus 1,5-fach und das PSEN-1-Gen 1,8-fach überexprimiert werden (Sadleir et al. 2018). Das unspezifische Signal zeigt eine starke Streuung der Daten, wodurch keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Bereichen erkennbar sind. Das unspezifische Signal umfasst die Autofluoreszenz verschiedener Moleküle und kann nicht klar zugeordnet werden. Eine Autofluoreszenz entsteht bei konjugierten Doppelbindungen, die beispielsweise Lipide enthalten, oder bei der Einbettung von LR-White. Dadurch ist nicht genau festzustellen, wie die Autofluoreszenz entsteht. Dementsprechend ist die große Variabilität der Daten nicht überraschend. In den Linescans des unspezifischen Signals, die besonders im Zentrum eine große Streuung aufweisen, ist die Inkorporation von <sup>13</sup>C gleichbleibend. Die Linescans der Aggregate zeigen einen sigmoidalen Verlauf mit einem geringen Einbau im Zentrum, der in Richtung Peripherie signifikant ansteigt. Auch die Linescans der Nicht-Aggregate verlaufen sigmoidal, auch wenn sie zu den Aggregaten gegenläufig sind. Der stärkste <sup>13</sup>C-Einbau zeigt sich im Zentrum und fällt in Richtung Peripherie ab. Möglicherweise werden Aß-Proteine daher im Zentrum neusynthetisiert, wodurch ältere Aβ-Proteine weiter in die Peripherie gedrängt und abgegeben werden. Yan et al. (2009) vermutet, dass der Aβ-Einbau konzentrationsabhängig in die Plaques erfolgt, dementsprechend lässt die Veränderung der Inkorporation vom Zentrum in die Peripherie auf eine höhere Konzentration der Proteine mit <sup>13</sup>C-Inkorporation schließen. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass sich Aggregate und Nicht-Aggregate über mehrere Tage bilden. Somit bestätigen die Resultate die Vermutung von Yan et al. (2009) und Burgold et al. (2011), dass das Plaquewachstum ein Prozess über mehrere Tage ist und nicht, wie Meyer-Luehmann et al. (2008) angenommen hat, eine schnelle Entwicklung innerhalb eines Tages (Abbildung 27). Zusätzlich zeigt sich durch den sigmoidalen Verlauf der Aggregate im Zentrum eine geringe Inkorporation, die erst ab ungefähr 0,21 µm anfängt zu steigen. Dieser Einbau bekräftigt die Annahme von Michno et al. (2021), dass sich als erster Aggregationsschritt ein stabiler Kern bildet und anschließend durch homologe Anlagerung wächst (Abbildung 28). Die Ergebnisse können jedoch nicht die Annahme von Nilsson et al. (2007) bestätigen, dass die Plaques ein unstrukturiertes Zentrum mit einer strukturierten Peripherie aufweisen.



Abbildung 28: Dynamik der Plaqueformation in Abhängigkeit von der Zeit mit NanoSIMS; <sup>13</sup>C-Einbau A-J) über 11 Wochen in Mäusewoche 7-17, K-0) über 4 Wochen in Mäusewoche 6-10, P-T) über 4 Wochen in Mäusewoche 10-14. Abbildung entstammt Michno et al. (2021) und wurde mit der Creative-Commons-Lizenz 4.0 (CC BY-NC) publiziert.

55

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Aβ-Plaques bezogen auf die Fragestellung weder eine absolute strukturelle Stabilität noch eine vollständige Dynamik aufweisen. Vielmehr implizieren die Resultate ein stabiles Zentrum mit einer dynamischen Peripherie. Dementsprechend können die Plaques als metastabil bezeichnet werden.

Die Mäuselinie Tau-P301L überexprimiert humanes Tau-Protein und bildet Tau-Aggregate (Terwel et al. 2005). Bisher ist nur wenig über die Bildung der NFT bekannt. Möglicherweise kann dies darauf zurückgeführt werden, dass die Tauaggregation im Sinne der Amyloidkaskadentheorie lange als Resultat der Aβ-Plaques angesehen wurde und erst seit einiger Zeit an Bedeutung für die Pathogenese von Alzheimer gewinnt. Die Ergebnisse der untersuchten Tau-P301L-Mäuse weisen eine große Ähnlichkeit zu den Ergebnissen der 5xFAD-Mäuse auf. Auch in der Tau-P301L-Mäuselinie besitzen die Aggregate den geringsten und die Nicht-Aggregate den stärksten Einbau. Im Gegensatz zu den 5xFAD-Mäusen zeigt das unspezifische Signal in der Tau-P301L-Mäuselinie jedoch eine geringere Streuung der Daten und ist außerdem der <sup>13</sup>C-Inkorporation des Hintergrunds ähnlich. Außerdem zeigen sich auch signifikante Unterschiede zwischen dem unspezifischen Signal und dem Nicht-Aggregat bzw. dem Aggregat, was eventuell auf die geringere Variabilität der Daten zurückgeführt werden kann. Bei den Linescans zeigen sich ebenfalls ähnliche Ergebnisse wie bei den 5xFAD-Mäusen. Die Aggregate besitzen im Zentrum einen signifikant geringeren <sup>13</sup>C-Einbau als in der Peripherie. Die Linescans der Nicht-Aggregate weisen einen gegenläufigen, vom Zentrum in die Peripherie abfallenden <sup>13</sup>C-Einbau auf. Auch die Linescans des unspezifischen Signals zeigen in der Peripherie eine geringere Inkorporation des stabilen Isotops als im Zentrum. Des Weiteren ist auffallend, dass die Streuung der Daten bei den Tau-P301L-Aggregaten stärker ist, obwohl mehr Präparate untersucht wurden. Diese Schwankungen in den Daten könnten darauf hindeuten, dass die untersuchten Tau-Aggregate zu unterschiedlichen Zeiten gebildet wurden und daher - bei der Annahme eines stabilen Zentrums wie bei den 5xFAD-Aggregaten – die Inkorporation variiert. Zusätzlich wurden Gehirnschnitte verschiedener Gehirnareale für die Analyse genutzt. Es ist bekannt, dass sich Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen ausbreiten können (Tiwari et al. 2019). Mit ungefähr sechs Monaten zeigen die 5xFAD-Mäuse zahlreiche Plaques in Hippocampus und Cortex, welche sich mit steigendem Alter in weitere Gehirnareale ausbreiten (Oakley et al. 2006). In der Tau-P301L-Maus ist die Ausbreitung noch nicht genau erforscht. In älteren Mäusen und teilweise auch in Mäusen ab sechs Monaten wird eine Ausbreitung unter anderem im Cortex, im Thalamus und im Gehirnstamm beschrieben (Terwel et al. 2005). Möglicherweise befanden sich die Tau-Aggregate im dreiwöchigen Zeitraum der Untersuchung in der Ausbreitung in ein neues Gehirnareal. Eine andere Erklärung könnte die schnellere Bildung der Aggregate sein. Die Überexpression von APP ist in den 5xFAD-Mäusen ungefähr 1,5-fach erhöht, wohingegen Tau in der Tau-P301L-Maus um das Zweifache überexprimiert wird (Terwel et al. 2005; Sadleir et al. 2018). Weil ein konzentrationsabhängiges Wachstum der Aggregate vermutet wird, könnte die übermäßige Bildung des Proteins zu vielen Aggregaten führen (Yan et al. 2009).

Zusammenfassend gesagt, ähneln die Ergebnisse der Tau-P301L-Mäuselinie den Resultaten der 5xFAD-Mäuselinie. Dadurch kann auf ein ähnliches Wachstumsmuster von Tau- und Aβ-Aggregaten geschlossen werden. Obwohl sich eine stärkere Streuung in den Daten der Tau-P301L-Mäuselinie zeigt, deuten die Ergebnisse ebenfalls metastabile Aggregate an.

### 4.2 Phosphoreinbau in Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen

Frühere Studien zeigen, dass sowohl die monomeren Aβ- und Tau-Proteine als auch die Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen phosphoryliert werden können. Die Phosphorylierung kann das monomere Aggregationspotenzial erhöhen bzw. die Aggregate stabilisieren (Kumar et al. 2013; Kumar und Walter 2011; Schneider et al. 1999; Iqbal et al. 2008). Die Phosphorylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die zu veränderten Proteineigenschaften führt (Ardito et al. 2017). Von den 21 proteinogenen Aminosäuren werden am häufigsten Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert (Ardito et al. 2017). Die Phosphorylierung am Serinrest-8 im Protein Aß fördert zum Beispiel die extrazelluläre Bildung von Aß-Oligomeren, die die Fibrillenbildung initiieren können und eine erhöhe Neurotoxizität aufweisen (Kumar et al. 2011; Kumar und Walter 2011). Zudem stabilisiert der Phosphoreinbau die neurotoxischen Aggregate, auch wenn die Phosphorylierung nach der Aggregatbildung erfolgt (Kumar et al. 2013; Rezaei-Ghaleh et al. 2016). Aus diesem Grund könnte die Phosphorylierung von Aß bei Alzheimer mit spätem Beginn relevant sein (Kumar und Walter 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in allen Bereichen einen geringen Phosphoreinbau in die Proteine. Zusätzlich zu dem Verhältnis <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N wurde zur Überprüfung der Ergebnisse das Verhältnis von Phosphor zu Schwefel errechnet. Schwefel kommt in den zwei Aminosäuren Methionin und Cystein vor, die in fast jedem Protein vorhanden sind (Rappel und Schaumlöffel 2008). Der Einbau von Schwefel ist eine übliche Methode für die Proteinquantifikation und dient der Bestimmung des Phosphorylierungsgrades (Rappel und Schaumlöffel 2008).

Die Ergebnisse der Verhältnisse <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S in der 5xFAD-Mäuselinie weisen einen ähnlichen Einbau auf. Nach beiden Bestimmungen zeigt sich die stärkste Phosphorylierung in den Aggregaten und die geringste im unspezifischen Signal. Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen dem unspezifischen Signal und den anderen Bereichen im Verhältnis <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N. Im Gegensatz dazu zeigt <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bereichen. Dieser Widerspruch in den statistischen Ergebnissen führt zu der Annahme, dass der Schwefeleinbau der untersuchten Präparate eventuell nicht mit der Proteinquantität gleichzusetzen ist. Es ist bekannt, dass Aβ an das negativgeladene Heparansulfat binden kann (Hosono-Fukao et al. 2012). Das sulfatierte Glykosaminoglykan fördert die Fibrillenbildung und schützt vor Abbau der Aggregate (Hosono-Fukao et al. 2012). Möglicherweise führt ein verstärkter Schwefeleinbau in den Aggregaten zu den nicht vollständig übereinstimmenden statistischen Ergebnissen. Allerdings zeigen beide Verhältnisse, dass sich der Phosphoreinbau zwischen Aggregat und Nicht-Aggregat nicht signifikant voneinander unterscheidet. Daraus könnte geschlossen werden, dass die Aggregatbildung der 5xFAD-Mäuse nicht stark von der Phosphorylierung beeinflusst wird. Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse sind mit sechs Monaten relativ jung. Eine Untersuchung von älteren Mäusen ist notwendig, um den Phosphoreinbau älterer Plaques zu untersuchen. Möglicherweise zeigt sich bei älteren Mäusen eine stärkere Phosphorylierung, die die Aggregate gegen Umwelteinflüsse stabilisiert (Rezaei-Ghaleh et al. 2016). Die fehlende Hyperphosphorylierung kann eventuell auf den Beginn der Plaquebildung zurückgeführt werden. Die 5xFAD-Mäuse bilden aufgrund der fünf familiären Mutationen frühzeitig Plaques (Oakley et al. 2006). Die Phosphorylierung wird jedoch besonders mit dem späten Beginn der Alzheimer assoziiert (Kumar und Walter 2011).

Das Protein Tau zeigt auch im physiologischen Zustand eine Phosphorylierung, die bei einer Alzheimererkrankung um das Vierfache steigen kann (Köpke et al. 1993). Eine Hyperphosphorylierung wurde ebenfalls im Alter oder bei einer Anästhesie nachgewiesen (Planel et al. 2007; Terwel et al. 2005). Eine Dephosphorylierung hingegen zeigt sich bei oxidativem Stress (Davis et al. 1997). Im Gegensatz zu anderen Mäuselinien zeigen frühere Studien an der Tau-P301L-Mäuselinie, dass die Tau-Aggregate erst mit ungefähr neun Monaten eine Hyperphosphorylierung aufweisen (Terwel et al. 2005). In jungen Tau-P301L-Mäusen zeigt sich sogar eine Tau-Dephosphorylierung (Terwel et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen diese Studien. Wie bei der 5xFAD-Mäuselinie wurde der Phosphoreinbau mithilfe der Verhältnisse <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S untersucht. Die Aggregate besitzen in beiden Verhältnissen den geringsten Phosphoreinbau, der sich signifikant von den Nicht-Aggregaten unterscheidet. Das Phosphor-Schwefel-Verhältnis zeigt zudem, dass sich Aggregate signifikant von dem unspezifischen Signal und Hintergrund unterscheiden. Möglicherweise können die verschiedenen statistischen Ergebnisse ebenfalls auf einen veränderten Schwefeleinbau zurückzuführen sein. Auch die Bildung der Tau-Neurofibrillen scheint durch die Bindung an Heparansulfat gefördert zu werden (Hosono-Fukao et al. 2012). Die Tau-P301L-Maus weist einen frühen Beginn der Tauopathie auf, in der sich durch eine mutationsbedingte Konformationsänderung und Proteinüberexprimierung eine schnelle Ausbildung der Aggregate zeigt (Terwel et al. 2005). Erst nach der Bildung der Aggregate zeigt sich eine Hyperphosphorylierung (Terwel et al. 2005). In anderen Studien wird jedoch eine altersbedingte Konformationsänderung von Tau beschrieben, die zu einer erhöhten Phosphorylierung führt (Noble et al. 2013). Die Phosphorylierung fördert anschließend die Aggregation (Iqbal et al. 2008). Möglicherweise führt die mutationsbedingte Konformationsänderung zu weniger Phosphorylierungsstellen oder zu einer Blockade der Phosphorylierungsstellen durch eine andere posttranslationale Modifikation wie der Glykosylierung. Eine Glykosylierung kann das Protein gegen Phosphorylierung schützen (Mandelkow und Mandelkow 2012). Ebenso könnte die Überexpression der Tau-P301L-Mäuselinie zu oxidativem Stress führen, sodass das Protein Tau dephosphoryliert (Davis et al. 1997). Eine mögliche Erklärung für die Hyperphosphorylierung der älteren Mäuse kann die Aktivität der Chaperone sein, die das Tau phosphorylieren können, um die β-Faltblätter abzuschirmen (Mandelkow und Mandelkow 2012). Eine weiterführende Studie mit transgenen Mäusen, die eine langsame Tauopathie wie in der sporadischen Alzheimer entwickeln, könnte das aggregationsfördernde Potenzial einer Hyperphosphorylierung untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den beiden Mäuselinien 5xFAD und Tau-P301L keine Hyperphosphorylierung nachzuweisen ist. Ein aggregationsförderndes Potenzial von Phosphor kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Durch die Überexpression werden vermehrt gekürzte Aβ- und Tau-Proteine gebildet, die ein hohes Aggregationspotenzial aufweisen. Möglicherweise ist eine erhöhte Phosphorylierung zeit- und altersabhängig und kann daher eher bei einer langsam progredienten Alzheimer die Aggregation fördern.

### 4.3 Relevanz der Ergebnisse für den Menschen

Die Resultate der untersuchten Mäuselinien deuten auf metastabile Aggregate hin, die ein stabiles Zentrum und eine dynamische Peripherie besitzen. Die Ergebnisse sind somit mit der Studie von Wildburger et al. (2018) kongruent, die in einem Alzheimerpatienten dynamische Plaques nachweisen konnten. Auch Wildburger et al. (2018) nutzten die NanoSIMS-Technik, um die <sup>13</sup>C-Inkorporation zu analysieren. Miyakawa et al. (1986) zeigen, dass das Zentrum der Aggregate aus Amyloidfibrillen geformt wird. Amyloidfibrillen gelten durch die Ausbildung vieler intramolekularer Bindungen als stabil (Knowles et al. 2007). Ebenso zeigen die dichten Plaques, die von Schmidt et al. (1995) untersucht wurden, ein Thioflavin-positives Zentrum. Thioflavin bindet an  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die für Amyloidfibrillen kennzeichnend sind (Chiti und Dobson 2017; Schmidt et al. 1995). Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren ebenfalls eine strukturelle Stabilität im Zentrum der Aggregate und es ist denkbar, dass das Zentrum aus Amyloidfibrillen besteht. Jedoch wurde in dieser Studie kein  $\beta$ -Faltblattbindender Farbstoff genutzt, daher kann die Existenz von Amyloidfibrillen nur vermutet werden. Die Annahme von Jin et al. (2003) hingegen, dass sich zunächst in der Peripherie der Aggregate Amyloidfibrillen ausbilden und sich das Zentrum erst danach einem Kristallisationsprozess unterzieht, kann nicht bestätigt werden. Ebenfalls können weder die Vermutung von Hyman et al. (1993), dass es keinen Proteineinbau in gebildeten Aggregaten gibt, noch die Annahme von Cruz et al. (1997), dass Plaques vollständig dynamisch sind, bekräftigt werden.

Für die Untersuchung wurden 27 Wochen alte Mäuse genutzt, die sich noch in der Phase der Plaqueausbreitung befinden. Die Phase der Plaqueausbreitung im Menschen umfasst die präklinische Phase, die beim Menschen viele Jahre andauert. Beim Übergang in das moderate Alzheimerstadium zeigt sich eine konstante Amyloidlast. Eine weitere Studie könnte mit der gleichen Methode den Aggregatmetabolismus in der Plateauphase untersuchen und den Metabolismus mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichen.

### 4.4 Limitationen der Arbeit

Transgene Mäuselinien werden seit vielen Jahren für die Alzheimerforschung genutzt, da sie wirtschaftlich in ihrer Haltung sind, eine kurze Lebensspanne von zwei Jahren besitzen und eine Ähnlichkeit zum menschlichen Genom aufweisen (Esquerda-Canals et al. 2017; Vierstra et al. 2014). Dennoch zeigen sich Limitationen in der Verwendung transgener Mäuselinien.

Mäuse bilden physiologisch Aβ-Proteine, die sich jedoch in drei Substituenten vom humanen Aβ unterscheiden und in geringeren Konzentrationen gebildet werden (Esquerda-Canals et al. nur in picomolaren Konzentrationen (Esquerda-Canals et al. 2017). Diese Unterschiede in Konzentration und Aufbau des Aβ-Proteins sowie die kurze Lebenserwartung könnten die Gründe dafür sein, dass Mäuse physiologisch keine Alzheimer ausbilden (Esquerda-Canals et al. 2017). Zusätzlich kann eine Mäuselinie nicht die gesamte Pathophysiologie von Alzheimer darstellen (Castellani et al. 2006). Obwohl sich Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen bei Alzheimer bilden, entstehen bei der 5xFAD-Mäuselinie nur Aβ-Plaques und bei der Tau-P301L-Mäuselinie nur Tau-Aggregate. Die 5xFAD-Mäuselinie ist durch fünf familiäre Mutationen gekennzeichnet, die zu einer 1,5-fachen Überexpression von humanem APP und zu einer 1,8-fachen Überexpression von humanem PSEN-1-Gen führen. Die Entstehung einer familiären Alzheimer im Menschen scheint hingegen nur von einer Mutation abhängig zu sein (Bekris et al. 2010). Eine Ausnahme hierbei bildet die schwedische Doppelmutation. Die Mutationen haben verschiedene Effekte - vier Mutationen führen zu einem erhöhten Verhältnis von Aβ-42 zu Aβ-40 und eine Mutation erhöht die Konzentration von APP - und beeinflussen sich gegenseitig, sodass sich die A $\beta$ -Pathologie in der Maus anders entwickelt (Oakley et al. 2006). Die Plaques der 5xFAD-

Mäuse sind kleiner sowie zahlreicher als humane Plaques und hauptsächlich intrazellulär lokalisiert (Oakley et al. 2006). Die Tau-P301L-Mutation führt zu einer frühen Ausbildung von Tau-Aggregaten durch eine zweifache Überexpression von Tau (Terwel et al. 2005). Diese Mutation ist eher für die frontotemporale Demenz und Parkinsonkrankheit typisch und führt zu der Ausbildung kleinerer Tau-Neurofibrillen (Terwel et al. 2005; Lewis et al. 2000). Dennoch wird die Mäuselinie verwendet, um die Tau-Pathologie zu untersuchen. Außerdem wird die Genexpression durch den Promoter bestimmt (Esquerda-Canals et al. 2017). Durch die Verwendung eines anderen Promoters kann sich die Genexpression verändern (Esquerda-Canals et al. 2017). Beispielsweise zeigt eine Mäuselinie mit der schwedischen Doppelmutation und dem Thy-1-Promoter eine siebenfache Überexpression, wohingegen die gleiche Mutation mit dem PrP-Promoter einen fünffachen Anstieg in der A $\beta$ -40- und einen 14-fachen Anstieg in der A $\beta$ -42 (43)-Konzentration zeigt (Esquerda-Canals et al. 2017).

Die durchschnittliche Lebensdauer von Mäusen beträgt ungefähr zwei Jahre. Eine besonders kurze Lebenserwartung von einem Jahr zeigen die Tau-P301L-Mäuse (The Jackson Laboratory). Dementsprechend zeigen transgene Mäuse eine deutlich schnellere Entwicklung der Pathologie als die Menschen (The Jackson Laboratory). Insbesondere im ersten Lebensmonat wird eine Entwicklung beschrieben, die 150-mal schneller ist (The Jackson Laboratory). Zwischen dem ersten und sechsten Monat entwickeln sich die Mäuse 45-mal schneller und ab dem sechsten Monat bleibt die Entwicklung 25-mal schneller als beim Menschen (The Jackson Laboratory). Die untersuchten Mäuselinien waren ungefähr sechs Monate alt, wodurch sie einer 30-jährigen Person entsprechen (The Jackson Laboratory). Alzheimer ist in über 90% eine altersabhängige Erkrankung mit einem späten Krankheitsbeginn (DGN und DGPPN 2016). Nur 1% bis 4% aller Alzheimererkrankungen sind auf eine familiäre Mutation zurückzuführen, die zu einem frühen Beginn führt und eine andere Pathophysiologie zeigt (DGN und DGPPN 2016). Des Weiteren sind geschlechterspezifische Unterschiede bekannt. Weibliche Mäuse der 5xFAD-Mäuselinie erreichen deutlich später das Plaqueplateau und weisen eine stärkere Phosphorylierung auf (Oakley et al. 2006; Bhattacharya et al. 2014). Das Geschlecht der untersuchten Mäuse in dieser Arbeit ist nicht bekannt.

Neben der Verwendung von Mäuselinien zeigen sich weitere Limitationen in der Bildentstehung und -bearbeitung. Die Präparate wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Aβ bzw. Tau angefärbt. Die Färbung gibt somit keinen Aufschluss über β-Faltblattstrukturen, die kennzeichnend für Alzheimeraggregate sind. Die zusätzliche Anfärbung mit Thioflavin ist eine häufig verwendete Methode für die Aggregatbestimmung. In dieser Untersuchung wurden stattdessen die Aggregate durch gemeinsame Signale der Antikörperfärbung und der Autofluoreszenzfärbung definiert, da der Hauptbestandteil der Aggregate das Aβ- oder Tau-Protein ist und eine Autofluoreszenz in Aggregaten zum Beispiel durch Lipidinklusionen nachgewiesen wurde (Wildburger et al. 2018). Das Aggregationspotenzial der Proteine Tau und Aβ steigt, wenn die Proteine gekürzt werden (Tabaton und Piccini 2005; Cotman et al. 2005). Bei den 5xFAD-Mäusen wird der N-Terminus gekürzt (Tabaton und Piccini 2005). Weil der Antikörper 6E10 am N-Terminus des Aβ-Proteins bindet, können zwar die APP-Proteine jedoch nicht die gekürzten Aβ-Proteine dargestellt werden (Hunter und Brayne 2017). Die PHF-1-Antikörperfärbung bei den Tau-P301L-Mäusen kann hingegen gekürztes und ungekürztes Tau anfärben (Otvos et al. 1994). Weitere Limitationen zeigen sich in den bildgebenden Verfahren. Bei der Fluoreszenzmikroskopie kommt es zum Ausbleichen und Quenching des Präparats. Die NanoSIMS-Technik ist destruktiv, da ein Sekundärionenstrahl aus der Oberfläche des Präparats generiert wird. Daher können die Präparate nur einmal genutzt werden. Zusätzlich kann es zu Verzerrungen in den Bildern kommen, wenn der Primärionenstrahl nicht vollkommen senkrecht auf das Präparat trifft. Bei Bildbearbeitung mit speziellen Programmen können ebenfalls Ungenauigkeiten auftreten, die sich eventuell auf die anschließende Analyse auswirken.

### 4.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse implizieren einen metastabilen Metabolismus der Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen in den transgenen Mäusen, da sich ein stabiles Zentrum mit einem geringen <sup>13</sup>C-Einbau sowie eine dynamische Peripherie mit einer stärkeren <sup>13</sup>C-Inkorporation bilden. Des Weiteren scheint der Aggregationsprozess eher das Resultat der Proteinüberexpression als das Ergebnis einer Hyperphosphorylierung zu sein. Dennoch kann ein aggregationsförderndes Potenzial der Phosphorylierung bei einer langsameren Aggregatbildung und einem späteren Beginn der Alzheimer nicht ausgeschlossen werden.

## 5 Zusammenfassung

Alzheimer ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung, von der weltweit 50 Millionen Menschen betroffen sind. Hauptmerkmale sind das sich progredient verschlechternde klinische Erscheinungsbild und die pathologische Akkumulation von den Proteinen Aβ und Tau. Die aggregierten Proteinakkumulationen werden als Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen bezeichnet. Der Metabolismus dieser Aggregate wird kontrovers diskutiert. Es ist bisher nicht vollständig geklärt, ob die Aβ-Plaques und Tau-Neurofibrillen eine strukturelle Stabilität aufweisen oder sich durch ständige Umbauprozesse in einem dynamischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung befinden. Außerdem wird vermutet, dass die Aggregation durch eine erhöhte Phosphorylierung der Aβ- und Tau-Proteine gefördert wird und deswegen hyperphosphorylierte Aggregate entstehen. Ziel dieser Arbeit ist es, den Metabolismus der Aggregate und ihren Phosphoreinbau zu untersuchen. Hierbei wurde die isotopische Zusammensetzung der Plaques und ihrer Umgebung mithilfe der Nanoskala-Sekundärionen-Massenspektrometrie (NanoSIMS) analysiert.

Für die Untersuchung wurden die transgenen Mäuselinien 5xFAD und Tau-P301L ausgewählt. Die 5xFAD-Mäuselinie besitzt fünf familiäre Alzheimermutationen, die zu einer Aβ-Plaque-Bildung führen. Die Tau-P301L-Mäuselinie bildet durch die P301L-Mutation Tau-Neurofibrillen aus. Die 27 Wochen alten Mäuse wurden über drei Wochen mit <sup>13</sup>C-Lysin reicher Nahrung gefüttert. Lysin ist eine Aminosäure, die für den Aufbau anderer Aminosäuren und somit für die Bildung neuer Proteine benötigt wird. <sup>13</sup>C ist ein stabiles Isotop, das physiologisch zu 1,05% vorkommt. Nach den drei Wochen wurden die Mäuse mit Paraformaldehyd perfundiert und Gehirnschnitte angefertigt. Die Gehirnschnitte wurden mit Antikörpern gegen humanes Aß (Antikörper 6E10) bzw. gegen humanes Tau (Antikörper PHF-1) angefärbt, in LR-White eingebettet und anschließend Mikrotomschnitte angefertigt. Mit den Präparaten wurden zwei Fluoreszenzbilder und sieben NanoSIMS-Bilder erstellt. Mit den Fluoreszenzbildern konnten die vier Bereiche Aggregat, Nicht-Aggregat, unspezifisches Signal und Hintergrund definiert werden. Mit der Nano-SIMS-Technologie konnte die isotopische Zusammensetzung dieser Bereiche bestimmt werden, wodurch Rückschlüsse auf den Metabolismus gezogen wurden. Um den Einbau der Isotope in die Proteine zu analysieren, wurden die Isotopenverhältnisse <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N, <sup>31</sup>P/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N und <sup>31</sup>P/<sup>32</sup>S ermittelt und statistisch untersucht. Zusätzlich wurden Linescans erstellt, die die Isotopenverhältnisse <sup>13</sup>C<sup>14</sup>N/<sup>12</sup>C<sup>14</sup>N vom Zentrum der Aggregate, Nicht-Aggregate und unspezifischen Signale in die Peripherie zeigten. Die Aggregate wiesen sowohl in der 5xFAD als auch in der Tau-P301L-Mäuselinie einen signifikant geringeren <sup>13</sup>C-Einbau auf als in den anderen Bereichen. Zudem zeigte sich ein signifikant höherer Einbau in der Peripherie der Aggregate im Vergleich zu dem Zentrum. Auf die Fragestellung bezogen, ob die A
ß-Plaques und Tau-Neurofibrillen eine strukturelle Stabilität aufweisen oder ständigen Umbauprozessen unterliegen, implizieren die Ergebnisse metastabile Aggregate. Im Zentrum scheint sich ein strukturell stabiler Kern zu bilden, wohingegen die Peripherie in einem Gleichgewicht mit der Umgebung steht und eine Dynamik zeigt. Die zweite Vermutung, dass hyperphosphorylierte Aggregate entstehen, kann nicht bestätigt werden. Die Tau-P301L-Mäuse zeigen sogar eine geringere Phosphorylierung. In den 5xFAD-Mäusen zeigt sich lediglich ein tendenziell höherer Phosphoreinbau in die Aggregate im Vergleich zu den anderen Bereichen. Daher scheint die Aggregation eher das Resultat der Proteinüberexpression zu sein. Dennoch ist ein aggregationsförderndes Potenzial der Phosphorylierung bei einer langsameren Aggregatbildung und einem späteren Beginn der Alzheimer nicht auszuschließen.

## 6 Literaturverzeichnis

Adnan H, Zhang Z, Park HJ, Tailor C, Che C, Kamani M, Spitalny G, Binnigton B, Lingwood C (2016): Endoplasmic Reticulum-Targeted Subunit Toxins Provide a New Approach to Rescue Misfolded Mutant Proteins and Revert Cell Models of Genetic Diseases. PloS one <u>11</u>, e0166948

Alzheimer's association (2018): 2018 Alzheimer's Disease Facts and Figures. Alzheimer's Association 14, 367-429

Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L (2017): The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). Int J Mol Med <u>40</u>, 271–280

Arosio P, Knowles TPJ, Linse S (2015): On the lag phase in amyloid fibril formation. Phys Chem Chem Phys <u>17</u>, 7606–7618

Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008): Adapting proteostasis for disease intervention. Science <u>319</u>, 916–919

Balchin D, Hayer-Hartl M; Hartl FU (2016): In vivo aspects of protein folding and quality control. Science <u>353</u>, 42–56

Bandyopadhyay B, Li G, Yin H, Kuret J (2007): Tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy. J Biol Chem <u>282</u>, 16454–16464

Baratchi S, Evans J, Tate WP, Abraham WC, Connor B (2012): Secreted amyloid precursor proteins promote proliferation and glial differentiation of adult hippocampal neural progenitor cells. Hippocampus <u>22</u>, 1517–1527

Baumgart M, Snyder HM., Carrillo MC, Fazio S, Kim H, Johns H (2015): Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. J Alzheimer Dis <u>11</u>, 718–726

Bejanin A, Schonhaut DR., La Joie R, Kramer JH, Baker SL, Sosa N, Ayakta N, Cantwell A, Janabi M, Lauriola M (2017): Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. Brain <u>140</u>, 3286–3300

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010): Genetics of Alzheimer disease. J Geriatr Psychiatry Neurol <u>23</u>, 213–227

Bertram L, Tanzi RE (2008): Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. Nat Rev Neurosci <u>9</u>, 768–778
Bhattacharya S, Haertel C, Maelicke A, Montag D (2014): Galantamine slows down plaque formation and behavioral decline in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. PloS one <u>9</u>, e89454

Biolegend (2018): Purified anti-β-Amyloid, 1-16 Antibody, 1-3

Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB (2002): Amyloid ßprotein (Aß) assembly: AB40 and AB42 oligomerize through distinct pathways. PNAS <u>100</u>, 330– 335

Bleiholder C, Dupuis NF, Wyttenbach T, Bowers MT (2011): Ion mobility-mass spectrometry reveals a conformational conversion from random assembly to  $\beta$ -sheet in amyloid fibril formation. Nat Chem <u>3</u>, 172–177

Braak H, Braak E (1991): Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol <u>82</u>, 239–259

Braak H, Del Tredici K (2011): The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol <u>121</u>, 171–181

Brehme M, Voisine C, Rolland T, Wachi S, Soper JH, Zhu Y, Orton K, Villella A, Garza D, Vidal M, Ge H, Morimoto RL (2014): A chaperome subnetwork safeguards proteostasis in aging and neurodegenerative disease. Cell Rep <u>9</u>, 1135–1150

Bryan KJ, Lee HG, Perry G, Smith M, Casadesus G (2009): Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. J Neurosci <u>2</u>, 1–17

Buccarello L, Grignaschi G, Castaldo AM, Di Giancamillo A, Domeneghini C, Melcangi RC, Borsello T (2017): Sex Impact on Tau-Aggregation and Postsynaptic Protein Levels in the P301L Mouse Model of Tauopathy. J Alzheimer-Dis <u>56</u>, 1279–1292

Burgold S, Bittner T, Dorostkar MM, Kieser D, Fuhrmann M, Mitteregger G, Kretzschmar H, Schmidt B, Herms J (2011): In vivo multiphoton imaging reveals gradual growth of newborn amyloid plaques over weeks. Acta Neuropathol <u>121</u>, 327–335

Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998): Neuron loss in APP transgenic mice. Nature <u>395</u>, 755–756

Carlred L, Michno W, Kaya I, Sjövall P, Syvänen S, Hanrieder J (2016): Probing amyloid-β pathology in transgenic Alzheimer's disease (tgArcSwe) mice using MALDI imaging mass spectrometry. J Neurochem <u>138</u>, 469–478

Caroni P (1997): Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. J Neurochem <u>71</u>, 3–9

Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Nunomura A, Perry G, Smith MA (2006): Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. Acta Neuropathol <u>111</u>, 503–509

Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F (2015): Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. J Proteomics <u>15</u>, 3175–3192

Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Shimoda M, Matsuoka M, Aiso S (2009): Amyloidb causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. Mol Psychiatry <u>14</u>, 206–222

Chiti F, Dobson CM (2017): Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. Annu Rev Biochem <u>86</u>, 27–68

Cho JH, Johnson GVW (2004): Glycogen synthase kinase 3 beta induces caspase-cleaved tau aggregation in situ. J Biol Chem <u>279</u>, 54716–54723

Christie RH, Bacskai BJ, Zipfel WR, Williams RM, Kajdasz ST, Webb WW, Hyman BT (2001): Growth Arrest of Individual Senile Plaques in a Model of Alzheimer's Disease Observed by In Vivo Multiphoton Microscopy. J Neurosci <u>21</u>, 858–864

Ciryam P, Kundra R, Freer R, Morimoto RI, Dobson CM, Vendruscolo M (2016): A transcriptional signature of Alzheimer's disease is associated with a metastable subproteome at risk for aggregation. PNAS <u>113</u>, 4753–4758

Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A et al. (1997): Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid ß-protein in both transfected cells and transgenic mice. Nat Med <u>3</u>, 67– 72

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977): Physical and Chemical Properties of Purified Tau Factor and the Role of Tau in Microtubule Assembly. J. Mol Biol <u>116</u>, 227–247

Cohen M, Appleby B, Safar JG (2016): Distinct prion-like strains of amyloid beta implicated in phenotypic diversity of Alzheimer's disease. Prion <u>10</u>, 9–17

Cohen ML, Kim C, Haldiman T, ElHag M, Mehndiratta P, Pichet T, Lissemore F, Shea M, Cohen Y, Chen W et al. (2015): Rapidly progressive Alzheimer's disease features distinct structures of amyloid-β. Brain <u>138</u>, 1009–1022 Cohen SIA, Linse S, Luheshi LM, Hellstrand E, White DA, Rajah L, Otzenc DE, Vendruscolo M, Dobson CM, Knowles TPJ (2013): Proliferation of amyloid-β42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. PNAS <u>110</u>, 9758–9763

Cotman CW, Poon WW, Rissmann RA, Blurton-Jones M (2005): The Role of Caspase Cleavage of Tau in Alzheimer Disease Neuropathology. J Neuropathol <u>64</u>, 104–112

Cruz L, Urbanc B, Buldyrev SV, Christie R, Gómez-Isla T, McNamara M, Stanley HE, Hyman BT (1997): Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer Disease. PNAS <u>94</u>, 7612–7616

Cupers P, Orlans I, Craessaerts K, Annaert W, De Strooper B (2001): The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragmentgenerated by g-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture, J Neurochem <u>78</u>, 1168–1178

DAlzG (2020): Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. Informationsblatt. https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/Alz/pdf/factsheets/infoblatt1\_ haeufigkeit\_ demenzerkrankungen\_dalzg.pdf; abgerufen am 27.10.2020

Davis DR, Anderton BH, Brion JP, Reynolds CH, Hanger DP (1997): Oxidative Stress Induces Dephosphorylation of τ in Rat Brain Primary Neuronal Cultures. J Neurochem <u>68</u>, 1590–1597

De Strooper B, Annaert W (2000): Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. J Cell Science <u>113</u>, 1857–1870

Dickson DW, Crystal HD, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P; Yen SH, Aronson MK (1991): Identification of Normal and Pathological Aging in Prospectively Studied Nondemented Elderly Humans. Neurobiol Aging <u>13</u>, 179–189

DGN, DGPPN (2016): S3-Leitlinie Demenzen der deutschen Gesellschaft für Neurologie und der deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde. https://www.awmf.org/uploads/tx\_szleitlinien/038-013l\_S3-Demenzen-2016-07.pdf; abgerufen am 21.09.2020

Dobson CM (2003): Protein folding and misfolding. Nature 426, 884-890

Dries DR., Yu G (2008): Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res <u>5</u>, 132–146

Drubin DG, Kirschner MW (1986): Tau Protein Function in Living Cells. J Cell Biol <u>103</u>, 2739– 2746 Drummond E, Nayak S, Faustin A, Pires G, Hickman RA, Askenazi M, Cohen M, Haldiman T, Kim C, Han X et al. (2017): Proteomic differences in amyloid plaques in rapidly progressive and sporadic Alzheimer's disease. Acta Neuropathol <u>133</u>, 933–954

Drummond E, Nayak S, Pires G, Ueberheide B, Wisniewski T (2018): Isolation of Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles from Archived Alzheimer's Disease Tissue Using Laser-Capture Microdissection for Downstream Proteomics. Methods Mol Biol <u>1723</u>, 319–334

Dumanchin C, Camuzat A, Campion D, Verpillat P, Hannequin D, Dubois B, Saugier-Vebier P, Martin C, Penet C, Charbonnier F et al. (1998): Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism. Hum Mol Genet <u>7</u>, 1825–1829

Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL (2008): Function and structure of inherently disordered proteins. Curr Opin Struct Biol <u>18</u>, 756–764

Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B et al. (1997): A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of  $A\beta 42(43)$ . Hum Mol Genet <u>6</u>, 2087–2089

Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003): Reconstitution of y-Sekretase activity. Nat Cell Biol <u>5</u>, 486–488

Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S (2017): Mouse Models of Alzheimer's Disease. J Alzheimer-Dis <u>57</u>, 1171–1183

Friguet B, Bulteau AL, Chondrogianni N, Conconi M, Petropoulos I (2000): Protein Degradation by the Proteasome and Its Implications in Aging. Ann NY Acad Sci <u>908</u>, 143–154

Frost B, Jacks RL, Diamond MI (2009): Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. J Biol Chem <u>284</u>, 12845–12852

Goedert M, Spillantini M G, Potier M C, Ulrich J, Crowther R A (1989): Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. EMBO J <u>8</u>, 393– 399

Goedert M, Spillantini MG (2017): Propagation of Tau aggregates. Mol Brain 10, 18

Gorlovoy P, Larionov S, Pham TTH, Neumann H (2009): Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. FASEB J <u>23</u>, 2502–2513

Gowrishankar S, Yuan P, Wu Y, Schrag M, Paradise S, Grutzendler J, De Camilia P, Ferguson SM (2015): Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques. PNAS <u>112</u>, 3699–3708

Hardy JA, Higgins GA (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science <u>256</u>, 184–185

Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's diesaes. Science <u>12</u>, 383–388

Hardy J, Selkoe DJ (2002): The amyloid Hypothesis of Alzheimers Diseas. Science <u>297</u>, 353–356

Hartl FU (2017): Protein Misfolding Diseases. Annu Rev Biochem 86, 21-26

Hatami A, Monjazeb S, Milton S, Glabe CG (2017): Familial Alzheimer's Disease Mutations within the Amyloid Precursor Protein Alter the Aggregation and Conformation of the Amyloid- $\beta$  Peptide. J Biol Chem <u>292</u>, 3172–3185

Herrup K (2010): Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. J Neurosci <u>30</u>, 16755–16762

Herrup K (2015): The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. Nat Neurosci <u>18</u>, 794–799

Herukka SK, Simonsen AH, Andreasen N, Baldeiras I, Bjerke M, Blennow K, Engelborghse S, Frisonih GB, Gabryelewiczj T, Galluzzi S et al. (2017): Recommendations for cerebrospinal fluid Alzheimer's disease biomarkers in the diagnostic evaluation of mild cognitive impairment. J Alzheimer Dis <u>13</u>, 285–295

Hickman SE, Allison EK, El Khoury J (2008): Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. J Neurosci <u>28</u>, 8354–8360

Hofrichter J, Ross PD, Eaton WA (1974): Kinetics and Mechanism of Deoxyhemoglobin S Gelation: A New Approach to Understanding Sickle Cell Disease, PNAS <u>71</u>, 4864–4868

Hosono-Fukao T, Ohtake-Niimi S, Hoshino H, Britschgi M, Akatsu H, Hossain M, Nishitsuji K, Van Kuppevelt TH, Kimata K, Michikawa M et al. (2012): Heparan sulfate subdomains that are degraded by Sulf accumulate in cerebral amyloid ß plaques of Alzheimer's disease: evidence from mouse models and patients. Am J Pathol<u>180</u>, 2056–2067

Hsu F, Park G, Guo Z (2018): Key Residues for the Formation of Aβ42 Amyloid Fibrils. ACS omega <u>3</u>, 8401–8407

Huber CM, Yee C, May T, Dhanala A, Mitchell CS (2018): Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy. J Alzheimer-Dis <u>61</u>, 265–281

Hunter S, Brayne C (2017): Erratum to: Do anti-amyloid beta protein antibody cross reactivities confound Alzheimer disease research? J. Negat. Results Biomed <u>16</u>, 8

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A et al. (1998): Associationofmissense and5-splice-site mutations intauwith the inherited dementia FTDP-17. Nature <u>393</u>, 702–705

Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL (1984): Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. Science <u>225</u>, 1168–1170

Hyman BT, Marzloff K, Arriagada P (1993): The Lack of Accumulation of Senile Plaques or Amyloid Burden in Alzheimer's Diesase Suggests a Dynamic Balance Between Amyloid Deposition and Resolution. J Neuropathol <u>52</u>, 594–600

Iqbal K, del C. Alonso A, Grundke-Iqbal I (2008): Cytosolic Abnormally Hyperphosphorylated Tau But Not Paired Helical Filaments Sequester Normal MAPs and Inhibit Microtubule Assembly. J Alzheimers Dis <u>14</u>, 365–370

Jack CR, Wiste HJ, Weigand SD, Rocca WA, Knopman DS, Mielke MM, Lowe VJ, Senjam ML, Gunter JL, Preboske GM et al. (2014): Age-specific population frequencies of cerebral  $\beta$ -amyloidosis and neurodegeneration among people with normal cognitive function aged 50–89 years: a cross-sectional study. Lancet Neurol <u>13</u>, 997–1005

Jarrett JT, Lansbury PT (1993): Seeding "One-Dimensional Crystallization of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie? Cell <u>73</u>, 1055-1058

Jin LW, Claborn KA, Kurimoto M, Geday MA, Maezawa I, Sohraby F, Estrada M, Kaminksy W, Kahr B (2003): Imaging linear birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies. PNAS <u>100</u>, 15294-15298

Kabatas S, Vreja IC, Saka SK, Höschen C, Kröhnert K, Opazo F, Rizzoli SO, Diederichsen U (2015): A contamination-insensitive probe for imaging specific biomolecules by secondary ion mass spectrometry. Chem Commun <u>51</u>, 13221–13224

Kadir A, Almkvist O, Forsberg A, Wall A, Engler H, Långström B, Nordberg A (2012): Dynamic changes in PET amyloid and FDG imaging at different stages of Alzheimer's disease. Neurobiol Aging <u>33</u>, 198.e1–198.e14

Kametani F, Hasegawa M (2018): Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. Front Neurosci <u>12</u>, 25 Kim J, Chakraberty P, Hanna A, March A, Dickson DW, Borchelt DR, Golde T, Janus C (2013): Normal cognition in transgenic BRI2-Aβ mice. Molecular Neurodegeneration <u>8</u>, 15

Knowles TP, Fitzpatrick AW, Meehan S, Mott HR, Vendruscolo M, Dobson CM, Welland ME (2007): Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. Science <u>318</u>, 1900–1903

Knowles TPJ, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SIA, Aguzzi A, Venduscolo M, Terentjev EM, Welland ME, Dobson CM (2009): An Analytical Solution to the Kinetics of Breakable Filament Assembly. Science <u>326</u>, 1533–1537

Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Del C. Alonso A, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993): Microtubuleassociated Protein Tau. J Biol Chem <u>268</u>, 24374–24384

Kumar S, Rezaei-Ghaleh N, Terwel D, Thal DR, Richard M, Hoch M, Mc Donald JM, Wüllner U, Glebov K, Heneka MT et al. (2011): Extracellular phosphorylation of the amyloid  $\beta$ -peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. EMBO J <u>30</u>, 2255–2265

Kumar S, Walter J (2011): Phosphorylation of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. Aging <u>3</u>, 8

Kumar S, Wirths O, Theil S, Gerth J, Bayer TA, Walter J (2013): Early intraneuronal accumulation and increased aggregation of phosphorylated Abeta in a mouse model of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol <u>125</u>, 699–709

Lee JE, Han PL (2013): An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions. Exp Neurol <u>22</u>, 84–95

Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Murphy MP, Baker M, Yu X et al. (2000): Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. Nat Genet <u>25</u>, 402–405

Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, Duff K (2012): Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology In Vivo. PloS one <u>7</u>, e31302

Liu Q, Waltz S, Woodruff G, Ouyang J, Israel MA, Herrera C, Sarsoza F, Tanzi RE, Koo EH, Ringman JM et al. (2014): Effect of potent  $\gamma$ -secretase modulator in human neurons derived from multiple presenilin 1-induced pluripotent stem cell mutant carriers. JAMA Neurol <u>71</u>, 1481–1489

Mandelkow EM, Mandelkow E (2012): Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. Cold Spring Harb Perspect Med <u>2</u>, a006247

Massey AC, Kiffin R, Cuervo AM (2006): Autophagic defects in aging: looking for an "emergency exit"? Cell cycle <u>5</u>, 1292–1296

Matveev SV, Spielmann HP, Metts BM, Chen J, Onono F, Zhu H, Scheff SW, Walker LC, LeVine III H (2014): A distinct subfraction of A $\beta$  is responsible for the high-affinity Pittsburgh compound B-binding site in Alzheimer's disease brain. J Neurochem <u>131</u>, 356–368

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R et al. (2011): The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. J Alzheimer Dis <u>7</u>, 263–269

Medina M, Avila J (2014): The need for better AD animal models. Front Pharmacol 5, 227

Menta BW, Swerdlow RH (2019): An Integrative Overview of Non-Amyloid and Non-Tau Pathologies in Alzheimer's Disease. Neurochem Res <u>44</u>, 12–21

Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, De Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT (2008): Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Nature <u>451</u>, 720–724

Michno W, Stringer KM, Enzlein T, Passarelli MK, Escrig S, Vitanova K, Wood J, Blennow K, Zetterberg H, Meibom A et al. (2021): Following spatial Ab aggregation dynamics in evolving Alzheimer's disease pathology by imaging stable isotope labeling kinetics. Sci Adv <u>7</u>, eabg4855

Miyakawa T, Katsuragi S, Watanabe K, Shimoji A, Ikeuchi Y (1986): Ultrastructural studies of amyloid fibrils and senile plaques in human brain. Acta Neuropathol <u>70</u>, 202–208

Miyasaka T, Watanabe A, Saito Y, Murayama S, Mann DMA, Yamazaki M, Ravid R, Morishima-Kawashima M, Nagashima K, Ihara Y (2005): Visualization of Newly Deposited tau in Neurofibrillary Tangles and Neuropil Threads. J Neuropathol <u>64</u>, 665–674

Moorad JA, Promislow DEL (2008): A theory of age-dependent mutation and senescence. Genetics <u>179</u>, 2061–2073

Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009): Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. PLoS Biol <u>7</u>, 0399–0414

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986): Identification of cDNA clones for the human microtubuleassociated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. Mol Brain Res <u>1</u>, 271–280

Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M (2009): APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. Nature <u>457</u>, 981–989

Nilsson KPR, Aslund A, Berg I, Nyström S, Konradsson P, Herland A, Inganäs O, Stabo-Eeg F, Lindgren M, Westermark GT et al. (2007): Imaging distinct conformational states of amyloidbeta fibrils in Alzheimer's disease using novel luminescent probes. ACS Chem Biol <u>2</u>, 553–560

Noble W, Hanger DP, Miller CCJ, Lovestone S (2013): The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. Front Neurol <u>4</u>, 83

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L et al. (2006): Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. J Neurosci <u>26</u>, 10129–10140

Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, Borchelt DR, Troncoso JC (2009): Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. Neurobiol Aging <u>30</u>, 1238–1244

Okamura N, Yanai K (2017): Brain imaging: Applications of tau PET imaging. Nature <u>13</u>, 197– 198

Otvos L, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VMY (1994): Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. J Neurosci <u>39</u>, 669–673

Parzych KR, Klionsky DJ (2014): An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. Antioxid Redox Signal <u>20</u>, 460–473

Plakoutsi G, Bemporad F, Calamai M, Taddei N, Dobson CM, Chiti F (2005): Evidence for a mechanism of amyloid formation involving molecular reorganisation within native-like precursor aggregates. J. Mol Biol <u>351</u>, 910–922

Planel E, Richter KEG, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB et al. (2007): Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. J Neurosci <u>27</u>, 3090–3097

Ramachandran G, Udgaonkar JB (2012): Evidence for the existence of a secondary pathway for fibril growth during the aggregation of tau. J Mol Biol <u>421</u>, 296–314

Rappel C, Schaumlöffel D (2008): The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis. Anal Bioanal Chem <u>390</u>, 605–615

Rasmussen J, Mahler J, Beschorner N, Kaeser SA, Häsler LM, Baumann F, Nyström S, Portelius E, Blennow K, Lashley T et al. (2017): Amyloid polymorphisms constitute distinct clouds of conformational variants in different etiological subtypes of Alzheimer's disease. PNAS <u>114</u>, 13018–13023

Rezaei-Ghaleh N, Amininasab M, Kumar S, Walter J, Zweckstetter M (2016): Phosphorylation modifies the molecular stability of β-amyloid deposits. Nat Commun <u>7</u>, 11359

Richter KN, Rizzoli SO, Jähne S, Vogts A, Lovric J (2017): Review of combined isotopic and optical nanoscopy. Neurophotonics <u>4</u>, 20901-1–20901-11

Robakis NK, Georgakopoulos A (2014): Allelic interference: a mechanism for trans-dominant transmission of loss of function in the neurodegeneration of familial Alzheimer's disease. Neurodegener Dis <u>13</u>, 126–130

Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK (2000): Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. Nature <u>405</u>, 531-532

Sadleir KR, Popovic J, Vassar R (2018): ER stress is not elevated in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. J Biol Chem <u>293</u>, 18434–18443

Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Sleegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J et al. (2011): Potent amyloidogenicity and pathogenicity of Aβ43. Nat Neurosci <u>14</u>, 1023–1032

Saka SK, Vogts A, Kröhnert K, Hillion F, Rizzoli SO, Wessels JT (2014): Correlated optical and isotopic nanoscopy. Nat Commun <u>5</u>, 3664

Schmidt ML, Robinson KA, Lee VMY, Trojanowski JQ (1995): Chemical and Immunological Heterogeneity of Fibrillar Amyloid in Plaques of Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Brains revealed by Confocal Microscopy. Am J Pathol <u>147</u>, 503–515

Schneider A, Biernat J, Von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM (1999): Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. Biochemistry <u>38</u>, 3549–3558

Schweers O, Schönbrunn-Hanebeck E, Marx A, Mandelkow E (1994): Structural Studies of Tau Protein and Alzheimer Paired Helical Filaments Show No Evidence for p-Structure. J Biol Chem <u>269</u>, 24290–24297

Selkoe DJ (2002): Alzheimer's disease is a synaptic failure. Science 298, 789-791

Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL (2000): Nucleated Conformational Conversion and the Replication of Conformational Information by a Prion Determinant. Science <u>289</u>, 1317–1321

Serrano-Pozo A, Mielke ML, Muzitansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Bacskai BJ, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT (2012): Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol <u>71</u>, 694–701

Sherrington R, Froelich S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, Levesque G, Rogaev EI, Lin C, Liang Y, Ikeda M et al. (1996): Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. Hum Mol Genet <u>5</u>, 985–988

Shin S, Kim D, Song JY, Jeong H, Hyeon SJ, Kowall NW, Ryu H, Pae AN, Lim S, Kim YK (2020): Visualization of soluble tau oligomers in TauP301L-BiFC transgenic mice demonstrates the progression of tauopathy. Prog Neurobiol <u>187</u>, 101782

Sparkman NL, Johnson RW (2008): Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. Neuroimmunomodulation <u>15</u>, 323–330

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002): Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. J Mol Cell Biol <u>156</u>, 1051–1063

Steinhauser ML.; Lechene CP (2013): Quantitative imaging of subcellular metabolism with stable isotopes and multi-isotope imaging mass spectrometry. Sem Cell Dev Biol <u>24</u>, 661–667

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA et al. (1997): Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. PNAS <u>94</u>, 13287–13292

Sultan A, Nesslany F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S et al. (2011): Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. J Biol Chem <u>286</u>, 4566–4575

Sun L, Zhou R, Yang G, Shi Y (2017): Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides by  $\gamma$ -secretase. PNAS <u>114</u>, E476–E485

Suppiah S, Didier MA, Vinjamuri S (2019): The Who, When, Why, and How of PET Amyloid Imaging in Management of Alzheimer's Disease-Review of Literature and Interesting Images. Diagnostics <u>9</u>, 9020065

Tabaton M, Piccini A (2005): Role of water-soluble amyloid-beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Int J Neuropathol Exp Neurol <u>86</u>, 139–145 Takahashi M, Miyata H, Kametani F, Nonaka T, Akiyama H, Hisanaga S, Hasegawa M (2015): Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. Acta Neuropathol <u>129</u>, 895–907

Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK (2002): Intraneuronal Alzheimer Aβ42 Accumulates in Multivesicular Bodies and Is Associated with Synaptic Pathology. Am J Pathol <u>161</u>, 1869–1879

Takashima A (2013): Tauopathies and tau oligomers. J Alzheimer-Dis 37, 565-568

Terwel D, Lasrado R, Snauwaert J, Vandeweert E, Van Haesendonck C, Borghgraef P, Van Leuven F (2005): Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. J Biol Chem <u>280</u>, 3963–3973

Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H (2006): The Development of Amyloid  $\beta$ Protein Deposits in the Aged Brain. Sci Aging Knowledge Environ <u>1</u>, 1–9

Thal DR, Rüb U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E, Del Tredici K, Braak E, Braak H (2000): Sequence of Aβ-Protein Deposition in the Human Medial Temporal. J Neuropathol <u>59</u>, 733– 748

The Jackson Laboratory (2020): Life span as a biomarker. https://www.jax.org/; abgerufen am 26.10.2020

Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M (2019): Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. Int J Nanomed <u>14</u>, 5541–5554

Trzepacz PT, Hochstetler H, Wang S, Walker B, Saykin AJ (2015): Relationship between the Montreal Cognitive Assessment and Mini-mental State Examination for assessment of mild cognitive impairment in older adults. BMC geriatrics <u>15</u>, 107

Twohig D, Nielsen HM (2019):  $\alpha$ -synuclein in the pathophysiology of Alzheimer's disease. Mol Neurodegener <u>14</u>, 23

Urbanc B, Cruz L, Buldyrev SV, Havlin S, Irizarry MC, Stanley HE, Hyman BT (1999): Dynamics of Plaque Formation in Alzheimer's Disease. Biophys J <u>76</u>, 1330–1334

Vierstra J, Rynes E, Sandstrom R, Zhang M, Canfield T, Hansen RS, Stehling-Sun S, Sabo PJ, Byron R, Humbert R et al. (2014): Mouse regulatory DNA landscapes reveal global principles of cis-regulatory evolution. Science <u>346</u>, 1007–1012 Villemagne VL, Pike KE, Chételat G, Ellis KA, Mulligan RS, Bourgeat P, Ackermann U, Jones G, Szoeke C, Salvado O et al. (2011): Longitudinal assessment of Aβ and cognition in aging and Alzheimer disease. Ann Neurol <u>69</u>, 181–192

Von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2001): Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure. J Biol Chem <u>276</u>, 48165–48174

Walker ES, Martinez M, Brunkan AL, Goate A (2005): Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. J Neurochem <u>92</u>, 294–301

Wattmo C, Wallin ÅK (2017): Early- versus late-onset Alzheimer's disease in clinical practice: cognitive and global outcomes over 3 years. Alzheimers Res Ther <u>9</u>, 70

Wildburger NC, Gyngard F, Guillermier C, Patterson BW, Elbert D, Mawuenyega KG, Schneider T, Green K, Roth R, Schmidt RE et al. (2018): Amyloid-β Plaques in Clinical Alzheimer's Disease Brain Incorporate Stable Isotope Tracer In Vivo and Exhibit Nanoscale Heterogeneity. Front Neurol <u>9</u>, 169

Wippold FJ, Cairns N, Vo K, Holtzman DM, Morris JC (2008): Neuropathology for the neuroradiologist: plaques and tangles. AJNR Am J Neuroradiol <u>29</u>, 18–22

Wisniewski T, Boutajangout A (2010): Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease in transgenic mouse models. Brain Struct Funct <u>214</u>, 201–218

World Alzheimer Report 2015 (2015): The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. ADI https://www.alzint.org/resource/world-alzheimer-report-2015; abgerufen am 15.12.2020

Yan P, Bero AW, Cirrito JR, Xiao Q, Hu X, Wang Y, Gonzales E, Holtzman DM, Lee JM (2009): Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. J Neurosci <u>29</u>, 10706–10714

Yen SS (2011): Proteasome degradation of brain cytosolic tau in Alzheimer`s disease. Int J Clin Exp Pathol <u>4</u>, 385–402

Youmans KL, Tai LM, Kanekiyo T, Stine WB, Michon SC, Nwabuisi-Heath E, Manelli AM, Fu Y, Riordan S, Eimer WA et al. (2012): Intraneuronal Aβ detection in 5xFAD mice by a new Aβspecific antibody. Mol Neurodegener <u>7</u>, 8

Yu JT, Tan L, Hardy J (2014): Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. Ann Rev Neurosci <u>37</u>, 79–100