

**Über die Bedeutung des CX₃CR₁-Rezeptors für den
Verlust von Spines und Dendriten im murinen
Alzheimer Modell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Miriam Hannes, geb. Chamoun

aus Köln

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Fuhrmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Gerd Rose

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.11.2021

Aus der Klinik und Poliklinik für Epileptologie und dem Deutschen Zentrum für
Neurodegenerative Erkrankungen
Direktor: Prof. Dr. Rainer Surges

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Morbus Alzheimer	7
1.1.1 Krankheitsverlauf und Therapie	7
1.1.2 Epidemiologie	8
1.1.3 Familiäre Alzheimer Demenz	8
1.1.4 Mikroglia und die Alzheimer Demenz	9
1.1.5 APP und A β	9
1.1.6 Tau	11
1.1.7 Präsenilin	12
1.2 Dendritische Spines	13
1.2.1 Morphologie von dendritischen Spines	14
1.2.2 Synaptische Plastizität und Synaptogenese	15
1.3 Mikroglia	16
1.3.1 Morphologie und Phänotypen von Mikroglia	16
1.3.2 Der Chemokin Rezeptor CX3CR1 und sein Ligand	17
1.4 Ziel dieser Forschungsarbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Verwendete Mauslinien	19
2.2 Transgene Mauslinien mit AD-ähnlicher Pathologie	19
2.3 Mauslinie CX3CR1-GFP	19
2.4 Mauslinie YFP-H	20
2.5 Verpaarung und verwendete Genotypen	20
2.6 Kraniale Hippokampus Fenster	21

2.7 2-Photonen Mikroskopie	22
2.7.1 Fluoreszenz	24
2.7.2 Laser Hardware	25
2.8 Datenaufnahme	26
2.9 Datenverarbeitung und Statistik	27
2.9.1 Analyse	27
2.9.2 Statistische Auswertung	28
2.9.3 Berechnung der Berührungsrates von Mikroglia	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Spinedichten	31
3.2 Spineverluste	34
3.3 Dendritenverlust	37
3.4 Berührungsrates von Mikroglia	39
4. Diskussion	41
4.1 Dichte und Verlust von Spines und Dendriten	41
4.2 Berührungsrates von Mikroglia	43
4.3 Herausforderungen und Schlussfolgerung	44
5. Zusammenfassung	46
6. Anhang	47
7. Abbildungsverzeichnis	50
8. Tabellenverzeichnis	51
9. Literaturverzeichnis	52
10. Danksagung	60

Abkürzungsverzeichnis

3xTg	Tripel Transgen
AD	Alzheimer Demenz
AICD	APP intracellular cytoplasmic / C-Terminal domain
APH-1	Anterior Pharynx Defective 1
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Vorläufer Protein, Englisch: amyloid precursor protein
APP-CTF-99	APP-Carboxyl-Terminal-Fragment-99
APP _{swe}	humane APP Variante, Englisch: APP swedish mutation
A β	Amyloid β -Peptid
CD	“Cluster of differentiation” Protein
CD-33	“Cluster of differentiation” Protein 33
CX3CL1	Spezifischer CX3CR1 Ligand
CX3CR1	CX3C-Rezeptor-1
CX3CR1-GFP	Knockin des grün fluoreszierenden Proteins im <i>CX3CR1</i> Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure, Englisch: desoxyribonucleic acid
FAD	Familiäre Alzheimer Demenz
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt, und Verbraucherschutz
MAPT	Gen für das Mikrotubuli-assoziierte Tau Gen
MT	Mikrotubuli
MTBR	Mikrotubuli Bindungsstellen, Englisch: microtubule binding repeats
N-Cad	N-Cadherin

N-Cad-CTF2	N-Cadherin-C-Terminal-Fragment-2
NCT	Nicastrin
NFT	Neurofibrilläre Tau Zusammenschlüsse, Englisch: neurofibrillary tau tangles
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
PS-1	Präsenilin-1
PS-2	Präsenilin-2
PS1dE9	Humane Präsenilin-1 Variante, Englisch: preseneline 1 delta E9
PSEN-2	Präsenilin Enhancer 2
p-Tau	Hyperphosphoryliertes Tau Protein
RNA	Ribonucleinsäure, Englisch: ribonucleic acid
sAPP- β	APP-Spaltprodukt
Spine	Dendritischer Spine
Tau	Tau-Protein
Tau _{mut}	Tau Mutanten
TauP301L	Humanes Tau mit P301L Mutation
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β , Englisch: transforming growth factor β
Thy1	Thymus Zell Antigen 1 Promotor
Thy1-YFP	Mauslinie mit YFP-Expression in Nervenzellen
TLR	Toll-like Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation, Englisch: World Health Organization
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein, Englisch: yellow fluorescent protein
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer Demenz (AD) ist eine Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS), welche zu progredienten kognitiven und mnestischen Defiziten führt (Alzheimer, 1907). Sie ist die häufigste Demenzform in westlichen Gesellschaften (Duthey, 2013). Seit der Entdeckung durch Alois Alzheimer im Jahre 1907 wurden zahlreiche wissenschaftliche Versuche unternommen, um mehr über die Krankheitsursachen zu erfahren. Durch wissenschaftliche Bemühungen konnte festgestellt werden, dass sich anhäufende Aggregate von Amyloid beta (A β) und neurofibrillären Tangles (NFT) regelhaft bei der AD nachweisen lassen (Alzheimer, 1907; Jellinger, 2002; Gandy and Heppner, 2013). Der genaue pathologische Hintergrund ist jedoch immer noch unklar.

1.1.1 Krankheitsverlauf und Therapie

Die Erstmanifestation beginnt in der Regel ab einem Alter von 65 Jahren und äußert sich in Form von milden mnestischen Defiziten, sowie Wortfindungs- und Orientierungsstörungen. Im Verlauf der Krankheit kommt es zu einer schleichenden Zunahme der Gedächtnisstörung und schließlich zum Verlust von basalen Alltagskompetenzen. Das klinische Bild erweitert sich typischerweise mit Voranschreiten der Krankheit um neuropsychiatrische Symptome wie Depressionen, Angstzustände und Agitiertheit. Zusätzlich können Krampfanfälle, Inkontinenz und Schluckstörungen auftreten. Besonders problematisch ist, dass die Krankheit in einer Bettlägerigkeit mündet und innerhalb von etwa sieben Jahren nach Diagnosestellung zum Tode führen kann (Andreas Hufschmidt, Carl Hermann Lücking, Sebastian Rauer, 2017).

Aktuell gibt es keine wirksame, kausale Therapie. In Deutschland sind für die medikamentöse Behandlung Acetylcholin-Esterase-Hemmer und Memantine zugelassen. Diese Substanzen zielen auf den Acetylcholin-Mangel bei der Krankheit ab und zeigen eine allenfalls leichte Wirkung hinsichtlich der Progredienz (Lanctôt *et al.*, 2003; Kaduszkiewicz *et al.*, 2005; Winblad *et al.*, 2007).

Die aktuelle Forschung mit therapeutischem Schwerpunkt beschäftigt sich vor allem mit Vakzinierung und Antikörpern gegen A β und Tau. Hiervon erhofft man sich, mittels Immuntherapie die A β und Tau Aggregate ausschalten zu können. Diese Studien befinden sich jedoch zum Großteil in experimentellen Phasen (Godyn *et al.*, 2016).

1.1.2 Epidemiologie

Die AD stellt aufgrund ihrer Epidemiologie die westlichen Gesellschaften vor sozioökonomische Probleme der Versorgung. Die statistische Korrelation zwischen höherem Alter und des Risikos, an AD zu erkranken, ist derweil unumstritten und mehrfach belegt. Demnach steigt das Risiko ab einem Alter von etwa 65 Jahren und erreicht ab 85 Jahren bereits einen Wert von 50 % (Duthey, 2013). Neben dem Alter gibt es eine Reihe anderer Risikofaktoren, die das Auftreten der AD begünstigen. Dazu zählen unter anderem arterielle Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus Typ II und Adipositas (Mayeux and Stern, 2012).

Zudem prognostizieren Metaanalysen eine exponentielle Erhöhung der Inzidenz in verschiedenen untersuchten Regionen wie beispielsweise Nord Amerika, Europa, Japan und Indien (Ziegler-Graham *et al.*, 2008). Einem Bericht der WHO aus dem Jahre 2013 zufolge leiden weltweit über 35 Millionen Menschen an AD. Angesichts des steigenden Durchschnittslebensalters in der westlichen Welt wird eine Verdoppelung der Inzidenz bis 2030, und eine Verdreifachung der diagnostizierten Fälle bis 2050 erwartet (Duthey, 2013).

1.1.3 Familiäre Alzheimer Demenz

Außer der sporadischen Alzheimer Form, bei der bis jetzt keine eindeutige Ursache gefunden wurde, ist auch eine familiäre Variante bekannt. Es konnten genetische Faktoren identifiziert werden, die mit der FAD assoziiert sind. Die Genmutationen betreffen vornehmlich das Amyloid Vorläufer Protein (APP), Präsenilin-1 und -2 (PS-1, resp. PS-2) und Apolipoprotein-E (APOE). Das Erstmanifestationsalter der FAD liegt unter 65 Jahren. Sie ist häufig in der engeren Verwandtschaft der Patienten verbreitet. Von der APP Mutation weiß man, dass sie signifikant häufiger zu schwerer Apraxie führt. Die PS-1 Mutation ist mit einem besonders frühen Krankheitsbeginn verknüpft (Shea *et al.*, 2016).

Die FAD ist für etwa 2 % der AD Fälle verantwortlich (dos Santos *et al.*, 2017). Die Entdeckung der genetischen Hintergründe hat einen großen Beitrag für die Erforschung der Krankheit geleistet. So konnte gezielt nach zellulären Veränderungen geforscht werden, welche mit den korrelierenden Mutationen einhergingen.

1.1.4 Mikroglia und die Alzheimer Demenz

Neuere Daten deuten auf einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen mikroglialen Entzündungsprozessen und der Entwicklung der AD hin: So konnten genetische Polymorphismen des mikroglialen Gens, welches für das sog. Cluster of differentiation Protein 33 (CD-33) codiert, bei Probanden mit sporadischer AD mit signifikanter Korrelation nachgewiesen werden (dos Santos *et al.*, 2017).

Das Gen für CD-33 befindet sich auf dem Chromosom 19. CD-33 ist ein Protein, welches als Oberflächen-Erkennungsstruktur von Immunzellen fungiert. Es vermittelt die Kommunikation zwischen Immunzellen (Jandus *et al.* 2011). In Meta-Analysen kaukasischer Populationen konnte ein protektiver Effekt gegen AD bei Fehlen der oben genannten Polymorphismen des Gens für CD-33 nachgewiesen werden (Carrasquillo *et al.*, 2011).

1.1.5 APP und A β

APP ist ein Transmembran-Protein mit einer intra- und extrazellulären Domäne. Das humane APP-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 21 codiert und umfasst circa 240 kb. Durch posttranslationale Splicingprozesse entstehen physiologische APP Varianten mit Längen zwischen 365 und 770 Aminosäuren (Zheng and Koo, 2006). APP stellt eine Vorläuferstruktur dar, welche durch Sekretasen in verschiedene Spaltprodukte zerlegt werden kann (siehe Abb. 1).

Die amyloidogene Prozessierung wird durch konsekutive Spaltung von APP durch eine β - und γ -Sekretase veranlasst. Dabei entsteht A β , welches akkumuliert und Aggregate bildet (Wang *et al.*, 2012). Die neurotoxische Wirkung dieser Aggregate konnte wiederholt nachgewiesen werden (Ono, Condron and Teplow, 2009; Shankar and Walsh, 2009; Mucke and Selkoe, 2012). A β bildet bei Akkumulation A β -Fibrillen bzw. -Plaques, wobei eine Toxizität dieser Ablagerungen diskutiert wird (Wang *et al.*, 2012).

Insbesondere gibt es Hinweise dafür, dass A β -Oligomere – also präfibrilläre Zusammenschlüsse von A β - toxische Effekte bei der AD unterhalten (Walsh and Selkoe, 2007). Diese ließen sich in unterschiedlicher Länge auch im Liquor von AD-Patienten nachweisen (Walsh *et al.*, 1997).

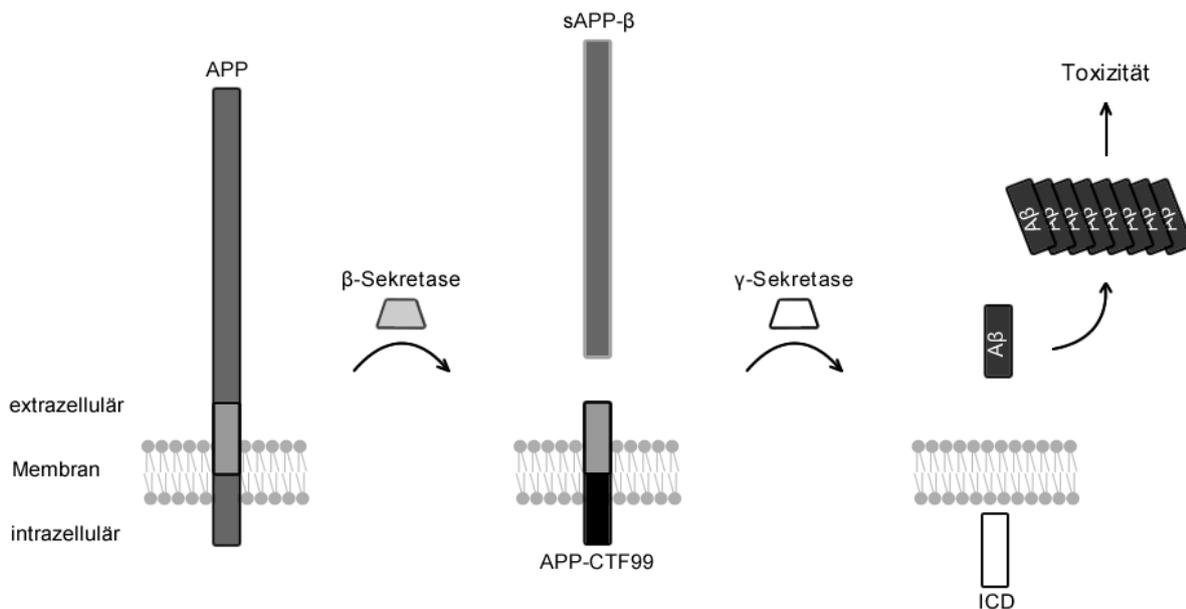


Abb. 1: Amyloide APP Prozessierung und Entstehung von A β

Die amyloide Prozessierung von APP führt zur Produktion von Amyloid- β -Peptiden (A β). Dabei wird APP zunächst durch die β -Sekretase gespalten, wobei APP-Carboxyl-Terminal-Fragment-99 (APP-CTF99) und ein lösliches APP-Derivat (sAPP- β) entstehen. Eine konsekutive Spaltung von APP-CTF99 durch die γ -Sekretase produziert A β und die intrazelluläre A β -Domäne (AICD). Aus A β Fragmenten können sich toxische, extrazelluläre Aggregate bilden (Wang *et al.*, 2012).

Unter anderem konnte infolge der A β -Plaquerbildung eine Verminderung präsynaptischer Kalzium-Kanäle und eine verringerte Ansprechbarkeit von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) nachgewiesen werden (Cohen *et al.*, 2013). Außerdem ist die Anzahl von Neuronen in A β -Plaquer Nähe vermindert, was sowohl im Großhirn als auch im Hippokampus von transgenen Alzheimer Ratten untersucht worden ist (Cohen *et al.*, 2013).

1.1.6 Tau

Das Tau-Protein ist ein zytosolisches Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches an der korrekten Mikrotubuli-Organisation der Zelle beteiligt ist (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015). Das Tau codierende Gen *MAPT* besteht aus 14 Exons. Durch Splicingprozesse entstehen verschiedene Tau-Varianten. Es sind sechs humane Varianten bekannt, welche zwischen 352 und 441 Aminosäuren lang sind (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2015).

Die physiologischen Funktionen von Tau umfassen unter anderem die Regulierung des Zytoskeletts und die Koordination intrazellulärer Transportprozesse (Billingsley and Kincaid, 1997). Durch Kinase-abhängige Phosphorylierung und Phosphatase-abhängige Dephosphorylierung kann die Aktivität von Tau reguliert werden (Billingsley and Kincaid, 1997; Brion, 1998). Es interagiert mit α - und β -Tubulin sowie mit Kinesin und Dynein, wodurch es Einfluss auf die zelluläre Morphologie und neuronale Plastizität nehmen kann (Dixit *et al.*, 2008; Elbaum-garfinkle *et al.*, 2014). Außerdem interagiert Tau mit PS-1, RNA und DNA, wobei die genaue Bedeutung dieses Zusammenhanges noch nicht vollständig verstanden ist (Maina, Al-Hilaly and Serpell, 2016).

Mutationen in *MAPT* führen zu fehlgefalteten Tau-Varianten (Strang, Golde and Giasson, 2019). Diese vermitteln ihre negativen Effekte zum einen durch Wegfallen der physiologischen Funktionen, und zum anderen durch direkte pathologische Funktionen (siehe Abb. 2). Es gibt Mutationen in *MAPT*, die zu einer Hyperphosphorylierung von Tau führen können. Dies wiederum erleichtert die Bildung sogenannter neurofibrillärer Tangles (NFT). NFTs konnten in Zusammenhang gebracht werden mit apoptotischen Prozessen (Gao Y, Tan L, Yu JT 2017).

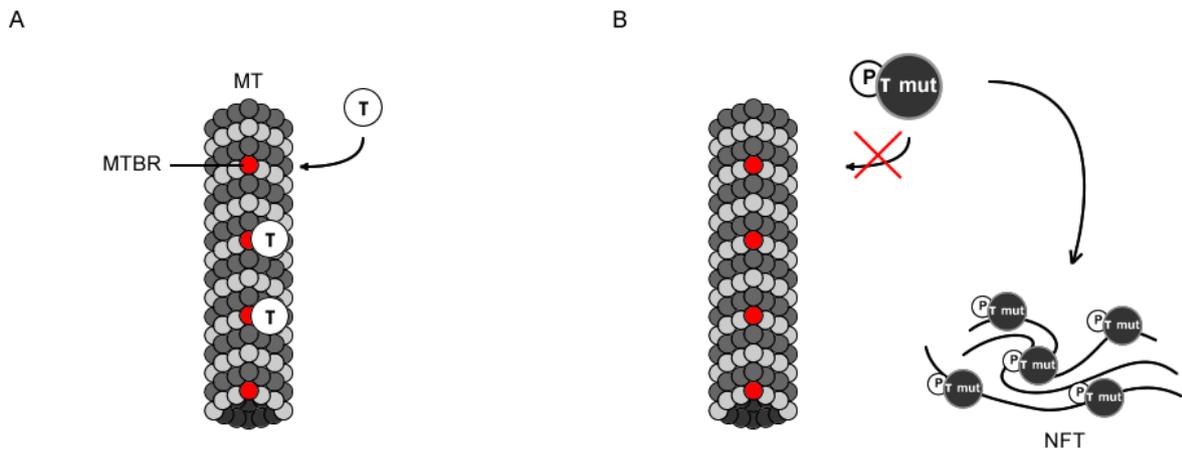


Abb. 2: Physiologische und pathologische Funktionen von Tau

A Die Bindungsstellen auf Mikrotubuli (MTBR) können von Tau (τ) besetzt werden. Tau nimmt so Einfluss auf die neuronale Plastizität und den axonalen Transport (Billingsley and Kincaid, 1997; Brion, 1998).

B Ein Funktionsdefizit von mutiertem Tau (Tau_{mut}) führt aufgrund einer Hyperphosphorylierung zur Bildung von NFT. NFT können Apoptose Prozesse induzieren und den neuronalen Zelltransport behindern, wodurch sowohl metabolische als auch elektrophysiologische Signalwege negativ beeinflusst werden (Gao Y, Tan L, Yu JT 2017).

Phosphoryliertes Tau findet sich in erhöhter Konzentration im Liquor von AD Patienten (Mattsson *et al.*, 2011, 2012). Es gibt Demenzformen, bei denen eine reine Tau-Pathologie vorliegt - beispielsweise die frontotemporale Demenz. Man bezeichnet diese Krankheiten deswegen auch als Tauopathien. Für die AD ist die Kombination aus A β - und Tau-Komponente charakteristisch (Rosenmann *et al.*, 2012).

1.1.7 Präsenilin

Präsenilin ist eine Aspartyl-Protease und ein Transmembranprotein. Gemeinsam mit den Transmembranproteinen Nicastrin (NCT), Präsenilin Enhancer 2 (PEN-2) und Anterior Pharynx Defective 1 (APH-1) bildet es den γ -Sekretase Komplex (siehe Abb. 3). Dieser Enzymkomplex ist für die Bildung von A β und AICD verantwortlich (Bergmans and De Strooper, 2010).

Präsenilin Mutationen führen dazu, dass das verbleibende APP Segment an einer abweichenden Stelle gespaltet wird. So entstehen vermehrt A β Fragmente mit einer Länge von 42 Aminosäuren. Diese Fragmente nennt man deswegen auch A β 42. Sie

aggregieren schneller als A β 40 und werden mit toxischen Effekten in Zusammenhang gebracht (Wolfe, 2006; Selkoe and Wolfe, 2007; Evin, 2008).

Durch Studien an Tiermodellen sind verschiedene Mutationen des PS-1 kodierenden Gens identifiziert worden. Die Mutante PS1dE9 fördert die Bildung von A β 42 und somit die Bildung von A β -Aggregaten, weswegen sie häufig zur Züchtung von AD-Tiermodellen genutzt wird (Bentahir *et al.*, 2006).

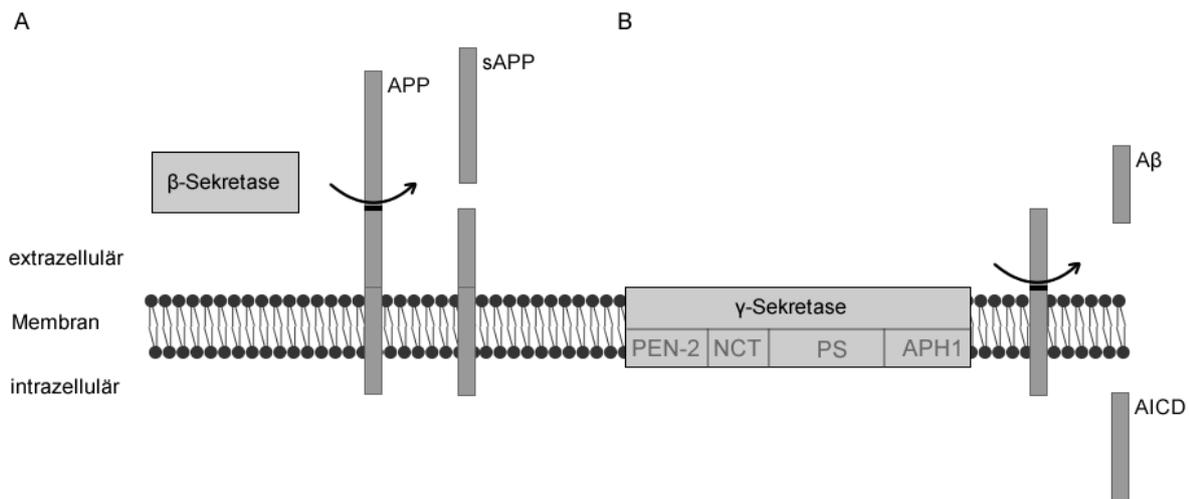


Abb. 3: Zusammensetzung und Funktion des γ -Sekretase Komplexes

A Die β -Sekretase spaltet im Extrazellulärraum das lösliche APP Spaltprodukt (sAPP) von APP ab.

B In einem weiteren Schritt spaltet die γ -Sekretase das verbleibende APP Segment in A β und AICD. Die γ -Sekretase ist ein Komplex aus den Transmembran-Proteinen Präsenilin-Enhancer 2 (PSEN-2), Nicastrin (NCT), Präsenilin (PS) und Anterior Pharynx Defective 1 (APH-1) (Bergmans and De Strooper, 2010).

1.2 Dendritische Spines

Cajal beschrieb im Jahre 1888 erstmals dendritische Spines im Kleinhirn von Vögeln (Ramón y Cajal, 1888). Spines sind pilzförmige Auswüchse auf Dendriten, die die Postsynapse darstellen. Spines empfangen die von Präsynapsen mittels Neurotransmitter eingehenden Signale und leiten sie weiter. Sie repräsentieren wichtige Zielstrukturen für erregende Eingänge an Neuronen im ZNS. Im menschlichen Gehirn schätzt man die Anzahl der Spines auf über 10^{13} . Typischerweise verfügen sie über Organellen und komplexe Signalsysteme. Sowohl ihre Bildung als auch ihr Abbau hängen von ihrer

synaptischen Aktivierung ab. Spines, welche regelmäßige Stimulierung erfahren, können so erhalten werden und sogar wachsen, wohingegen solche, die längere Zeit nicht aktiviert werden, abgebaut werden (Nimchinsky, Sabatini and Svoboda, 2002). Diese Umbaufähigkeit bezeichnet man als strukturelle Plastizität und wird als Grundvoraussetzung für z.B. Lernen und Gedächtnisbildung gesehen (Nimchinsky, Sabatini and Svoboda, 2002).

1.2.1 Morphologie von dendritischen Spines

Dendritische Spines können anatomisch unterteilt werden in Kopf und Hals. Der Kopf ist eine rundliche, membranöse, pilzförmige Struktur von etwa $0,001$ bis $1 \mu\text{m}^3$, welche über einen etwa $0.1 \mu\text{m}$ breiten Hals mit dem Dendriten verbunden ist. Dabei hängen die genauen Maße von der Gehirnregion ab (Kristen M. Harris, Kater, 1994).

Um die Vielfalt von Spines zu evaluieren wurde im Jahre 1968 eine morphologische Einteilung von Kaiserman-Abramof erstellt (Peters, Proskauer and Kaiserman-Abramof, 1968).

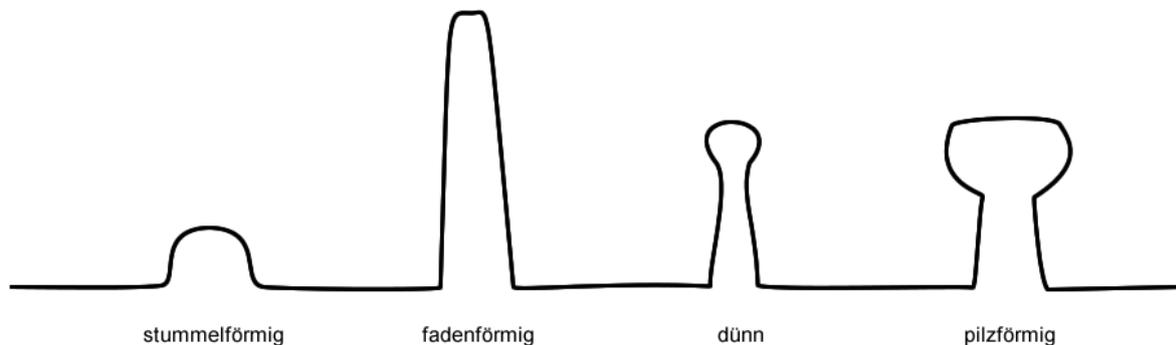


Abb. 4: Morphologische Einteilung von Spines nach Kaiserman-Abramof (Peters, Proskauer and Kaiserman-Abramof, 1968)

Die Einteilung beschreibt stummelförmige, fadenförmige, dünne und pilzförmige Spines (siehe Abb. 4).

Das Wachstum von Spines ist abhängig von der eingehenden synaptischen Aktivität (Annis, O'Dowd and Robertson, 1994; Jontes, Buchanan and Smith, 2000; Yuste, Majewska and Holthoff, 2000). Dabei gibt es eine Vielzahl zytosolischer Strukturen, die in Spines vorkommen, welche die Plastizität regulieren. Unter anderem besitzen Spines glatte endoplasmatische Retikuli, welche für Kalzium-Signalwege von besonderer

Bedeutung sind. Außerdem besitzen Spines Mitochondrien, diverse Signalmoleküle, Proteine und ein Zytoskelettsystem. All diese zytosolischen Strukturen tragen zur komplexen Signalverarbeitung am Spine bei (Gray and Guillery, 1963; Westrum *et al.*, 1980; Fiala, Spacek and Harris, 2002).

1.2.2 Synaptische Plastizität und Synaptogenese

Es gibt bis dato drei Modelle zur Erklärung der Synaptogenese:

Das erste nimmt Bezug auf die Motilität von fadenförmigen Spines und bezieht sich auf Zeitserien, die *in vivo* mit Hilfe von 2-Photonen-Mikroskopie aufgenommen wurden. Filopodiale Spines werden demnach als aktive Strukturen beschrieben, die nach nahegelegenen Synapsen suchen. Dabei strecken sie sich in die unmittelbare Umgebung aus, um beim Auftreffen auf synaptische Strukturen eine Bindung aufzubauen (Dailey and Smith, 1996; Ziv and Smith, 1996).

Das zweite Modell stellt den Prozess ähnlich dar. Jedoch besagt es, dass sich nach dem Kontakt mit einer Synapse keine Bindung aufbaut. Stattdessen ziehe sich der filopodiale Spine vollständig zurück. Erst danach bilde sich ein stabiler Spine aus. Filopodiale Spines werden also als transiente Strukturen verstanden, die sich allein auf das Suchen und Initiieren von neuen Synapsen spezialisieren (Kristen M. Harris, Kater, 1994).

Das dritte Modell besagt, dass dendritische Spines unabhängig von ihrer Morphologie mit einer bestimmten Umsatzrate auf- und abgebaut werden. Ein Spine bleibe demnach nur dann länger bestehen, wenn sich eine aktive Synapse in Kontaktreichweite befindet. Ist dies für eine bestimmte Zeit nicht der Fall, so würde er wieder abgebaut und verschwinden (Lendvai *et al.*, 2000).

Während die Prozesse, die der Synaptogenese zu Grunde liegen, nicht gänzlich geklärt sind, konnte ein Zusammenhang zwischen dem Alterungsprozess und einer Abnahme der Spinedichte mehrfach belegt werden: In verschiedenen Tiermodellen zeigt sich im Alter ein Verlust von Neuronen und Spines (Kato K1, Clifford DB, 1993; Dickstein *et al.*, 2013).

1.3 Mikroglia

Mikroglia wurden erstmals 1932 von dem spanischen Neuroanatomen Pio del Rio-Hortega als Zellen beschrieben, die im gesamten ZNS vorkommen und verschiedene Morphologien aufweisen (Kettenmann *et al.*, 2011). Sie besitzen typischerweise feine Ausläufer, sogenannte Filopodien, welche von einem schmalen Soma ausgehen. Sie können ihre Umgebung abtasten, sich vermehren und betreiben Phagozytose. Sie stammen von mesodermalen Vorläuferzellen ab und besiedeln das ZNS während der Embryonalentwicklung (Chan, Kohsaka and Rezaie, 2007; Napoli, Kierdorf and Neumann, 2009).

1.3.1 Morphologie und Phänotypen von Mikroglia

Es gibt verschiedene Signale, die eine morphologische Zustandsänderung bei Mikroglia bewirken können. In gesundem Gehirngewebe haben Mikroglia die Funktion eines Wächters. Dabei weisen sie einen schmalen Zellkörper mit langen, feinen Ausläufern auf. Ihre Umgebung wird von ihren motilen Fortsätzen aktiv nach pathologischen Signalen abgetastet (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn, Kirchhoff and Helmchen, 2005).

Inflammatorische, traumatische, ischämische, autoimmune und neurodegenerative Prozesse ändern den morphologischen Zustand. Dabei vergrößert sich das Soma, die Filopodien verdicken sich und ziehen sich zurück, wobei sie entlang eines chemotaktischen Gradienten mit dem Zellkörper zusammen zur geschädigten Region hinwandern. Diesen Zustand bezeichnet man als aktiviert (Kettenmann *et al.*, 2011). In dieser Form haben Mikroglia Ähnlichkeit mit Makrophagen. Sie können unter anderem Zelldebris, Protein-Aggregate und Pathogene erkennen und phagozytieren sowie selbst Chemokine abgeben, um andere Immunzellen anzulocken (Streit *et al.*, 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007; Colton and Wilcock, 2010; Graeber and Streit, 2010). Für diesen Zweck besitzen sie eine Reihe von Oberflächenrezeptoren. Dazu zählen sowohl sogenannte Cluster of differentiation Proteine (CD) wie beispielsweise CD-33, CD-36, als auch „Toll-like“ Rezeptoren (TLR) wie TLR-2, -4, -6 und -9 (Walter *et al.*, 2007; Hickman, Allison and El Khoury, 2008; Okun *et al.*, 2009). Mikroglia können auf diese Weise A β Fibrillen erkennen und phagozytieren, um diese dann einem endolysosomalen Abbau zuzuführen (Hickman, Allison and El Khoury, 2008).

Eine Einteilung von Mikroglia ist aufgrund der komplex orchestrierten proteomischen und transkriptionalen Aktivitäten dieser Zellen nicht trivial. Bisherige Untersuchungen der Gen- und Proteinexpression legen die Vermutung nahe, dass Mikroglia abhängig von verschiedenen Einflussfaktoren wie beispielsweise Läsionen, Alterungsprozessen oder Infektionen unterschiedliche Protein und mRNA Expressionsprofile aufweisen, um sich an Änderungen des zellulären Umfelds anpassen und auf diese reagieren zu können (Eggen *et al.*, 2013; Crotti and Ransohoff, 2016).

1.3.2 Der Chemokin Rezeptor CX3CR1 und sein Ligand

Chemokine sind eine große Familie von Signalproteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 8-12 kDa. Sie werden in vier Gruppen eingeteilt und als C-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokine (C, CC, CXC, CX3C) bezeichnet (Baggiolini, Dewald and Moser, 1997; Asensio and Campbell, 1999; Fernandez and Lolis, 2002).

Chemokine steuern diverse Regulationsmechanismen, welche für die Kommunikation und Interaktion zwischen Mikroglia und Neuronen von Bedeutung sind. Sie vermitteln zum Beispiel die chemotaktische Rekrutierung von aktivierten Mikroglia zum A β -Plaque. Huang *et al.* zeigten einen solchen Zusammenhang indirekt, indem sie durch Chemokin-neutralisierende Antikörper die Migration von Mikroglia zum A β -Plaque hin hemmten (Huang *et al.*, 2009). Hierbei beobachteten sie, dass die Größe der Plaques mit der Anzahl an rekrutierten Mikroglia korrelierte.

Der sogenannte CX3C-Rezeptor-1 (CX3CR1) ist für die Mikroglia-Neuron Interaktion wichtig. Er wird im ZNS von Mikroglia exprimiert und kann durch einen von Neuronen exprimierten Liganden (CX3CL1) aktiviert werden (Cardona *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011). In CX3CR1-defizienten AD Modellen zeigt sich eine Reduzierung der A β Ablagerungen und eine begünstigte Phagozytosefähigkeit von Mikroglia (Lee *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014). 2010 konnten Fuhrmann *et al.* außerdem zeigen, dass ein Fehlen des CX3CR1 in transgenen AD Mäusen mit einer höheren Überlebensrate von kortikalen Neuronen korreliert (Fuhrmann *et al.*, 2010).

1.4 Ziel dieser Forschungsarbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des mikroglialen Chemokinrezeptors CX3CR1 bezüglich des Verlustes von Dendriten und Spines im Hippokampus von transgenen Mäusen mit AD-ähnlicher Pathologie. Die zentrale Fragestellung zielt auf die neurotoxische Bedeutung des CX3CR1 für neurodegenerative Prozesse der AD ab (Cardona *et al.*, 2006; Fuhrmann *et al.*, 2010).

Um die Bedeutung des CX3CR1 für den Verlust von Dendriten und Spines unter AD-ähnlichen Konditionen zu analysieren, wurden Mausmodelle mit AD-ähnlicher Pathologie verwendet, wobei die Modelle jeweils eine Kombination von A β - und tau-Pathologie und eine isolierte A β -Pathologie aufwiesen. Zur mikroskopischen Visualisierung von Neuronen und Mikroglia wurden die o.g. Mausmodelle mit weiteren Mausmodellen gekreuzt, sodass das fluoreszierende Protein YFP in Neuronen und das fluoreszierende Protein GFP in Mikroglia exprimiert wurde. Um die Rolle des CX3CR1 in diesen Mausmodellen verstehen zu können, wurde in Mikroglia auch eine CX3CR1 Defizienz hervorgerufen. Durch 2-Photonen-*in vivo*-Mikroskopie wurden Dendriten und Spines in Relation zu Mikroglia im Hippokampus wiederholt über Wochen mikroskopisch durch kraniale Fenster visualisiert und die daraus entstehenden Daten analysiert. Dies ermöglichte eine zeitliche Analyse des Dendriten und Spine Abbaus in AD-ähnlichen Mausmodellen. Dabei konnte die Relevanz einer CX3CR1-Defizienz für diesen Abbau analysiert werden.

Diese Arbeit befasste sich also damit, inwiefern sich eine CX3CR1-Defizienz auf die Spinedichte, den Dendritenverlust und das Verhalten von Mikrogliafortsätzen an Spines unter AD-ähnlichen Bedingungen auswirkt. Dabei wurden auch die Faktoren Alter, Genotyp und Nähe zum A β -Plaques berücksichtigt.

Es ist denkbar, dass neurodegenerative Prozesse Mikroglia in einen Zustand chronischer Überaktivierung versetzen, was zu einem erhöhten Abbau neuronaler Strukturen führen könnte. Deswegen ist die Erforschung der Zusammenhänge zwischen mikroglialen Rezeptoren und dem Verhalten von Mikroglia in einem neurodegenerativen Umfeld von immenser Bedeutung. Sie könnte wichtige Erkenntnisse über die Pathophysiologie der AD liefern und so den Weg zu besseren Therapiemöglichkeiten ebnen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Mauslinien

Es wurden männliche und weibliche Tiere verwendet. Die Mäuse wurden in Gruppen von bis zu vier Mäusen pro Käfig gehalten. Sie unterlagen einem zwölf stündigen Tag-Nacht-Rhythmus und hatten uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Alle Versuche waren vereinbar mit den nationalen Bestimmungen für die Verwendung von Versuchstieren. Eine Tierversuchsgenehmigung vom Landesamt für Natur, Umwelt, und Verbraucherschutz (LANUV) lag vor.

2.2 Transgene Mauslinien mit AD-ähnlicher Pathologie

Um ein neurodegeneratives Milieu zu schaffen, das der AD ähnelt, wurden transgene Mäuse des sogenannten B6C3 Stammes ausgewählt, welche genetische Insertionen für eine humane *APP* Variante (*APP_{swe}*) und eine humane *PS1dE9* Variante besaßen (Jankowsky *et al.*, 2004). Die A β -Plaquebildung ist sowohl im Kortex als auch im Hippokampus ab etwa sechs Monaten nachweisbar.

In einer zweiten Mauslinie wurde eine andere Strategie verwendet: diese Mauslinie besaß neben der A β -Plauebildung auch eine Tau Pathologie. Die Mauslinie wurde generiert, indem in eine Knockin Mauslinie, die bereits homozygot für eine *Presenilin1* Mutation (*PS1_{M146V}*) war, zwei weitere Transgene per Pronukleusinjektion eingebracht wurden. Bei den Transgenen handelte es sich um eine humane *TAUP_{301L}* Mutation und eine *APP_{swe}* Mutation, die unter dem *Thymus Zell Antigen 1 Promotor (Thy1)* am gleichen Locus inseriert wurden (Oddo *et al.* 2003). Wegen der drei Transgene wird diese Mauslinie auch *3xTgAD* (tripel transgen AD) genannt. Die Mauslinie wurde von The Jackson Laboratory erworben.

2.3 Mauslinie CX3CR1-GFP

Es wurde das Gen für grün fluoreszierendes Protein (*gfp*) in das *Cx3cr1* Gen via Knockin inseriert. Hergestellt wurden diese transgenen Mäuse von Jung *et al.* im Jahre 2000 (Jung *et al.*, 2000). Durch die *gfp* Insertion in das Exon 2 des *Cx3cr1* Gens wurde die Funktion des Rezeptors zerstört. Deswegen exprimieren heterozygote Tiere nur auf einem Allel den Rezeptor und auf dem anderen GFP.

Homozygote $CX3CR1^{GFP/GFP}$ Tiere exprimieren den Rezeptor nicht mehr, sind also CX3CR1-defizient. Da das *Cx3cr1* Gen im Gehirn ausschließlich in Mikroglia exprimiert wird, sind sowohl in hetero- als auch in homozygoten Tieren die Mikroglia durch die GFP Expression darstellbar.

2.4 Mauslinie YFP-H

Um Nervenzellen, Dendriten und Spines mit dem Mikroskop visualisieren zu können, wurde eine Mauslinie verwendet, bei der ein Teil der erregenden Nervenzellen das gelb fluoreszierende Protein (YFP) herstellte (Feng *et al.*, 2000).

Diese Mauslinie entsteht durch eine Pronukleusinjektion eines modifizierten *Thy1.2* Promotors und dem dahinter klonierten *yfp*. Der hier angewendete *Thy1.2* Promotor besitzt das Exon 3 sowie die flankierenden Introns nicht. Diese sind für die Expression in nicht-neuronalen Zellen notwendig. Durch die Abwesenheit dieser Sequenzen ist eine präferenziell neuronale Expression gewährleistet (Feng *et al.*, 2000; Porrero *et al.*, 2010).

2.5 Verpaarung und verwendete Genotypen

Durch gezielte Verpaarung der oben beschriebenen Linien wurden sechs Mausgruppen gebildet.

Als Kontrollgruppen dienten Tiere, welche keine AD-ähnliche Pathologie aufwiesen. Hier wurden lediglich die YFP- und GFP-Transgene verwendet. Die Gruppe $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ war heterozygot, konnte also den CX3CR1-Rezeptor exprimieren. Die Gruppe $CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ war homozygot für den CX3CR1-GFP Knockin und somit Rezeptor-defizient. In beiden Mausgruppen konnten Mikroglia anhand ihrer GFP Expression und Neurone, Dendriten sowie Spines mittels YFP Expression visualisiert werden.

Als Gruppe mit AD-ähnlicher Pathologie wurden $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ oder $CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ mit $APP_{Swe}/PS1$ Tieren verpaart, sodass man $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ bzw. $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ erhielt. Bei den beiden letzten Gruppen wurden $3xTgAD$ Tiere mit $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ bzw. $CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ verpaart und man erhielt $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ bzw. $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$.

2.6 Kraniale Hippokampus Fenster

Tieren im Alter von etwa drei Monaten wurde ein kraniales Fenster implantiert. Die gesamte Prozedur wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Narkose erfolgte durch eine intraperitoneal injizierte Ketamin-/Xylazin-Lösung. Diese hatte eine Ketamin Konzentration von etwa 13,8 mg/ml und eine Xylazin Konzentration von 0,69 mg/ml. Pro Gramm Körpergewicht der Maus wurden 10 µl der Lösung injiziert. Die Augen der Maus wurden mit Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Nach Einleitung der Narkose wurde die Atemfrequenz (Thoraxbewegungen/min) bestimmt und eine Wärmeunterlage unter die Maus gelegt. Sobald zentral-vermittelte Muskeleigenreflexe z.B. durch Zwicken an Pfoten und Schwanz erloschen waren, wurde mit dem operativen Eingriff begonnen (siehe Abb. 5).

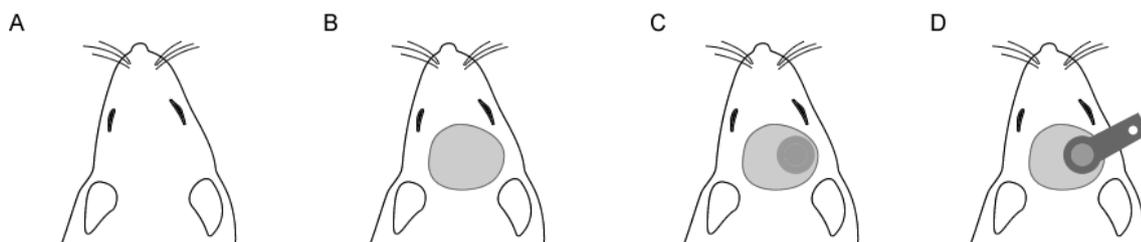


Abb. 5: Operativer Ablauf der Implantation eines kranialen Fensters

A Ansicht Mauskopf

B entfernte Kopfhaut

C kreisrunde Kraniotomie wird ausgebohrt und entfernt

D Anbringung des Fensters und der länglichen Halterung

Zu Beginn wurde ein Einschnitt in die Kopfhaut durchgeführt und der Schädel freigelegt (siehe Abb. 5B). Der Schädel wurde durch Abtupfen und leichtes Abkratzen des Periosts gesäubert und für eine bessere Zementhaftung vorbereitet. Danach wird mit Hilfe eines Bohrers ein kreisrundes Stück mit einem Durchmesser von etwa 4 mm aus dem Scheitelbein entfernt (siehe Abb. 5C). Hierbei muss ein Sicherheitsabstand zum median gelegenen Sinusvenensystem eingehalten werden. Anschließend werden die Meningen sowie kortikale Schichten vorsichtig entfernt, um bis zum Hippokampus vorzudringen. Daraufhin wird ein Aluminiumzylinder mit einem befestigten Deckgläschen passgenau eingebracht (siehe Abb. 5D). Der Zylinder wird mit medizinischer Zementmischung am Schädelknochen befestigt.

Die Tiere erhielten vor Beendigung der Narkose eine analgetische Medikation mittels Temgesic sowie eine einmalige Gabe Cefotaxim als perioperative antibiotische Prophylaxe. Außerdem erhielten die Tiere eine postoperative Analgesie mittels Temgesic für drei Tage.

Tab.: 1 Medikamente und Utensilien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Bepanthen Augensalbe	Bayer Vital GmbH, DE
Betaisodona	Mundipharma GmbH, DE
Cefotaxim	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, DE
Dexamethasone	Sigma Aldrich Corp., USA
Ketavet 10 %	Pfizer Deutschland GmbH, DE
Rompun 2%	Bayer Vital GmbH, DE
Temgesic	RB Pharmaceuticals Limited, UK
Biopsie Punch	48301, pfm medical AG, DE
Kreisrunde Deckgläser	4 mm, Engelbrecht Medizin & Labortechnik GmbH, DE
Bohrer	H71.104.004, Gebr.Brasseler GmbH & Co. KG, DE
Nadeln, 21G und 27G	4657705, B. Braun Melsungen AG, DE
Gewebe-Kleber	Henkel AG & Co., KGaA
Skalpell	0505, Swann Morton, UK
Gewebeschwamm	Gelita-Spon, Gelita Medical GmbH, DE
Zahn-Zement	A2 152254, Hager & Werken GmbH & Co. KG, DE

2.7 2-Photonen Mikroskopie

Ein 2-Photonen-Mikroskop ist ein spezielles Laser-Mikroskop, welches *in vivo* erstmals 1990 erfolgreich eingesetzt werden konnte (Denk, Strickler and Webb, 1990). Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass die Anregung eines Fluoreszenz-Moleküls nicht nur durch

ein Energie-reiches, kurzwelliges Photon, sondern auch durch zwei, Energie-arme, langwellige Photonen, welche unmittelbar nacheinander auftreffen, erzeugt werden kann (Göppert-Mayer, 1931). Dabei versetzen zwei nacheinander auftreffende Photonen ein Elektron im Fluoreszenz Molekül kurzzeitig in einen erhöhten Energiezustand, wobei beim Übergang in den ursprünglichen Energiezustand Energie in Form eines Photons freigesetzt wird. Dieses abgegebene Photon ist als Fluoreszenz messbar. Dabei müssen die beiden langwelligen Photonen jedoch unmittelbar nacheinander auf das Elektron treffen, damit eine Anregung erzeugt werden kann. Dafür werden bei der 2-Photonen-Mikroskopie gepulste Laser verwendet, welche Photonen in rascher Frequenz abfeuern können. Dadurch wird gewährleistet, dass die Photonen in kürzester Zeit in ihrer Fokusebene auf ein Fluoreszenz-Molekül treffen. Dabei werden die Laserstrahlen in einer Fokusebene gebündelt. In den optischen Ebenen darüber und darunter treffen die Photonen nicht zeitnah genug auf die Fluoreszenz-Moleküle, da sie dort nicht fokussiert sind. Deshalb reicht in diesen Ebenen die Energie der Photonen auch nicht aus, um Fluoreszenz hervorzurufen.

Das Prinzip der 2-Photonen-Mikroskopie hat dementsprechend mehrere Vorteile gegenüber der 1-Photonen-Mikroskopie:

1. Die notwendige Anregungsenergie der einzelnen Photonen ist geringer, als bei der 1-Photonen-Mikroskopie. Sie führt deswegen zu weniger phototoxischen Gewebeschäden.
2. Die Fluoreszenz wird nur in der Fokusebene – und nicht in den darüber und darunter liegenden optischen Schnittebenen - erzeugt. Dadurch kommt es zu geringeren „Ausbleichungseffekten“ der Proben.
3. Anders als bei der 1-Photonen-Mikroskopie ist keine Lochblende zum Ausblenden von Fluoreszenz-Signalen anderer optischer Schnittebenen notwendig.
4. Durch die Verwendung von längerwelligen Photonen verringern sich Streueffekte, da kurzwellige Photonen stärker streuen als langwellige. Dadurch können höhere Eindringtiefen erreicht werden (Diaspro *et al.*, 2006).

Nachteile der 2-Photonen-Mikroskopie sind zum einen die Hardwarekosten, zum anderen die Störanfälligkeit des Laserstrahlengangs. Der Strahlengang der Photonen wird durch sorgfältig platzierte Spiegel geleitet, wobei auch geringe Abweichungen der Spiegelpositionen zu einer Störung des Strahlenganges führen und auf diese Weise die Fokussierung beeinträchtigen können.

Insgesamt revolutionierte die 2-Photonen Mikroskopie die bildgebende Forschung. Insbesondere durch die Ermöglichung intravitale Aufnahmen konnten zelluläre Strukturen in ihrer natürlichen Umgebung - *in vivo* - beobachtet werden (Denk, Strickler and Webb, 1990). Bis zu 1 mm tiefe Strukturen können so im lebenden Tier bis in den μm -Bereich dargestellt werden (Benninger and Piston, 2013).

2.7.1 Fluoreszenz

Das Prinzip der Fluoreszenz wurde erstmals von Aleksander Jablonski im Jahre 1935 anhand des von ihm eingeführten Jablonski-Diagramms erläutert.

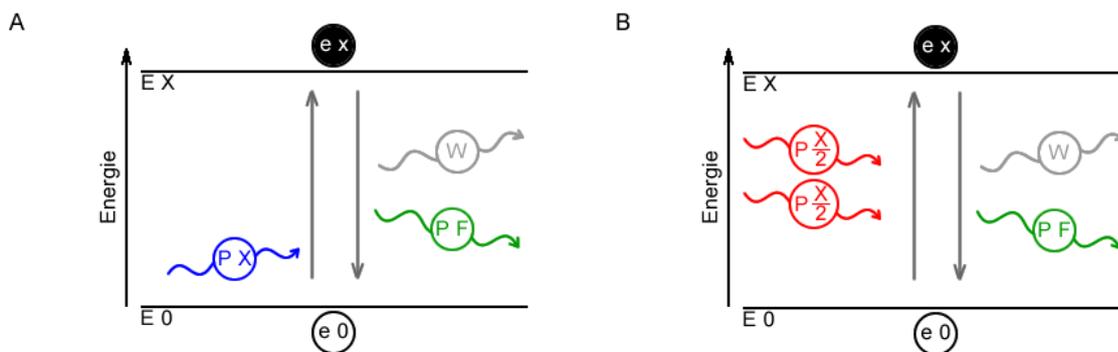


Abb. 6: Fluoreszenz-Schema in Anlehnung an das Jablonski-Diagramm

A Trifft ein Photon der Energie X (P_X) auf ein Elektron im Grundzustand (e_0), so springt dieses vom Energie Grundzustand (E_0) in einen erhöhten Energiezustand (E_X) und ist nun ein Elektron höherer Energie (e_x). Fällt (e_x) zurück auf (E_0), so wird die Energiedifferenz in Form von Wärme (W) und einem emittierten Photon (P_F) frei. (P_F) bildet die Fluoreszenz.

B Die Anregung von (e_0) wird durch zwei simultan auftreffende Photonen der Energie $\frac{x}{2}$ ($P_{\frac{x}{2}}$) bewerkstelligt. Es tritt der gleiche Effekt auf, wie bei einer Anregung durch (P_X).

Es beruht auf der Eigenschaft von Fluorophoren, durch Photonen bestimmter Energie angeregt werden zu können. Dabei trifft ein Photon einer bestimmten Wellenlänge auf ein Elektron des Fluorophors und bringt dieses in einen Zustand höherer Energie. Gelangt das erregte Elektron wieder in seinen ursprünglichen Zustand, so wird die Energiedifferenz in Form von Wärme und Licht frei. Das so emittierte Photon besitzt eine geringere Energie, als das Anregende. Es hat somit auch eine längere Wellenlänge. Diese Lichtemission kann als Fluoreszenz gemessen werden (siehe Abb. 6).

2.7.2 Laser Hardware

Für die Aufnahmen wurde das 2-Photonen-Mikroskop LSM7MP von *Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena Deutschland)* verwendet. Es besitzt neben einstellbaren Lasern ein System aus Detektoren (engl.: „*photomultiplier tube*“, PMT), mit welchen die Fluoreszenzsignale erfasst wurden. Zusätzlich wurde das Detektorsystem mit austauschbaren Filtern ausgestattet. Für die Detektion von Fluoreszenzsignalen wurden entsprechende Anregungswellenlängen und Filtersets für die emittierte Fluoreszenz verwendet (siehe Tab. 2).

Durch einen dichroiden Longpass Filter wurden die Wellenlängen bei 510 nm geteilt, sodass durch einen 480/40 nm Bandpass Filter das GFP sowie durch einen 535/30 nm Bandpass Filter das YFP detektiert werden konnte. Für die Darstellung der A β -Plaques wurde ein 450/60 nm Bandpass verwendet.

Tab.: 2 Verwendete Filtersets zur Darstellung der Fluoreszenzsignale

Fluorophor	Exzitationswellenlänge	Filter	Hersteller
GFP	920 nm	Bandpass 480/40 nm	<i>Zeiss, DE</i>
YFP-H	920 nm	Bandpass 535/30 nm	<i>Zeiss, DE</i>
		Longpass 510 nm	<i>Zeiss, DE</i>
Methoxy-X04	780 nm	Bandpass 450/60 nm	<i>Zeiss, DE</i>

Für alle Aufnahmen wurde ein 16x Objektiv (*Nikon GmbH; Tokyo Japan*) verwendet. Für eine präzise räumliche Positionierung der Maus zum Objektiv wurde ein zugehöriges Motorensystem verwendet. Um Übersichtsaufnahmen des kranialen Fensters zu erstellen, wurde eine digitale Kamera benutzt, welche am Okular des Mikroskops integriert ist.

A β -Plaques wurden durch intraperitoneal verabreichtes Methoxy-X04 (*Tocris Bioscience; Bristol Großbritannien*) markiert, welches zwei Stunden vor Beginn der Aufnahme appliziert wurde. Pro Gramm Körpergewicht der Maus wurden 50 μ g Methoxy-X04 injiziert.

2.8 Datenaufnahme

Die erste mikroskopische Aufnahme wurde etwa einen Monat nach der Operation erstellt, um eine hinreichende Erholungsphase zu gewährleisten. Die Mäuse wurden mit Ketamin-/Xylazin-Lösung (Konzentration Ketamin 13,8 mg/ml, Xylazin 0,69 mg/ml) narkotisiert. Die Augen wurden durch Auftragen von Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Die Fenster wurden vor jeder Messung gesäubert und auf mögliche Schäden hin geprüft. Bei ordnungsgemäßem Befund konnte die Maus anhand der implantierten Halterung am Mikroskop-Setup befestigt werden. Zum Schutz vor Unterkühlung wurde außerdem eine kleine Wärmeunterlage unterhalb der Maus angebracht.

Um eine bestimmte Region von Dendriten wiederholt messen zu können, musste eine Repositionierung durchgeführt werden. Dazu dienten oberflächliche Blutgefäße zur Orientierung, welche mit der digitalen Kamera des Systems dargestellt werden konnten. Anhand typischer Muster, die bei der ersten Aufnahme aufgezeichnet wurden, konnte so eine bestimmte Region wiedergefunden werden. Danach wurde eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme gemacht und mit dem ersten Zeitpunkt verglichen. Mit Hilfe der räumlichen Steuerelemente war eine Mikrometer-genaue Repositionierung möglich (siehe Abb. 7).

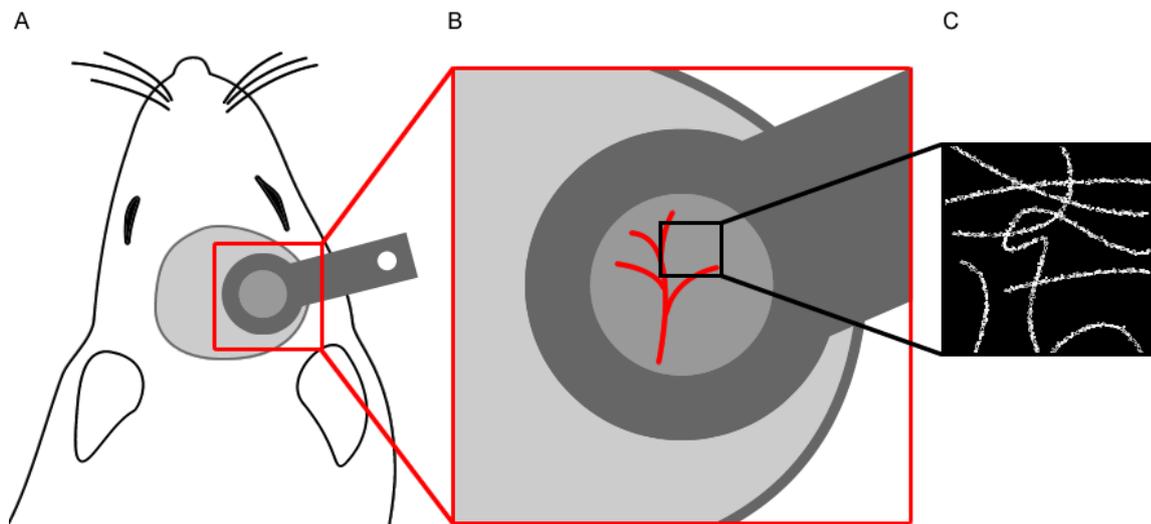


Abb. 7: Illustration der wiederholten Repositionierung von Bildausschnitten

A Übersicht mit Blick auf das implantierte intrakranielle Fenster

B Übersicht mit Hilfe der digitalen Kamera: Darstellung der oberflächlichen Gefäßarchitektur. Positionierung am gewählten Bereich.

C 2-Photonen-mikroskopische Darstellung der Dendriten in der Tiefe

Anschließend wurden mit der ZEN Software (*ZEN 2010 V6.0.0.309, Carl Zeiss MicroImaging GmbH*) Tiefenaufnahmen erstellt. Die so entstandenen Bilderstapel umfassten eine x-y-Ausdehnung von ca. $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ und eine z-Ausdehnung von etwa $100 \mu\text{m}$. Bei einem Tiefenabstand von einem μm ergaben sich so Stapel mit 90 - 120 Bildern bei einer Auflösung von 1039×1039 Pixel (siehe Abb. 8).

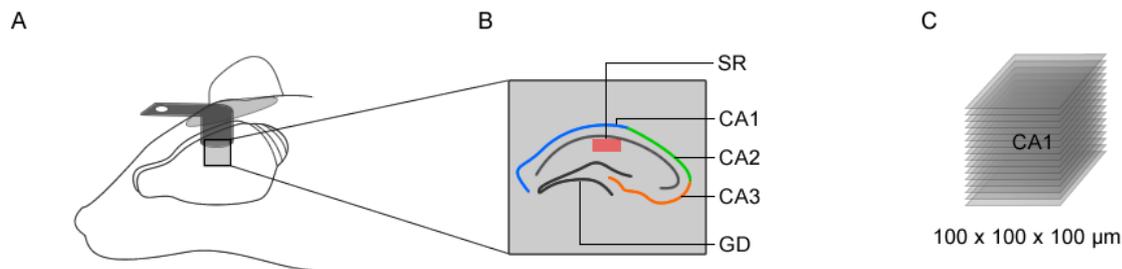


Abb. 8: Schema der CA1-Region und des Bilderstapels

A Umriss des Mausgehirns und Position des implantierten Fensters.

B Hippokampus Schema mit den Regionen CA1, CA2, CA3 und Gyrus Dentatus (GD); Stratum radiatum (SR) hier in Rot hervorgehoben.

C Im Stratum radiatum (SR) wurde ein Ausschnitt von $100 \times 100 \mu\text{m}$ in 100 Schichttiefen mit einem μm Abstand gemessen: es ergibt sich ein mikroskopiertes Gewebevolumen von $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$.

2.9 Datenverarbeitung und Statistik

2.9.1 Analyse

Die in den Messungen erzeugten Bilderstapel wurden mittels ImageJ (*ImageJ 1.48d, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA*) bearbeitet. Die Bilder wurden mit einem Median Filter (1×1 Pixel) gefiltert und für die weitere Bearbeitung im Dateiformat TIFF abgespeichert.

Mit Hilfe der ZEN Software konnten die Stapel ausgewertet werden. Um die Dendritenlängen zu bestimmen, wurde die Software auf die Parameter für Sichtfenster ($100 \times 100 \mu\text{m}^2$) und Pixel (1039×1039) geeicht.

Dann konnten mittels einer Zeichen-Funktion Dendriten und Spines markiert und in mehreren Schichten verfolgt werden. Für jede Maus wurden fünf bis zehn Dendriten mit einer Länge zwischen 25 und $60 \mu\text{m}$ an drei Zeitpunkten analysiert. Die ersten beiden Aufnahmen erfolgten in einem Alter von etwa 4 Monaten in einem Abstand von 4 Tagen. Die dritte Aufnahme erfolgte in einem Alter von etwa 7 Monaten.

Als signifikante Signalanhebung wurde jeder Pixelwert gezählt, welcher um das 2,5 fache größer war, als der gemittelte Hintergrund Wert. Eine Struktur wurde außerdem nur dann als Spine gezählt, wenn sie eine Breite von mindestens 0,4 μm hatte und aus dem Dendritenast um mindestens 0,4 μm hervorragte. Spines mit einem Abstand von mindestens 1,5 μm wurden doppelt gezählt.

Die so akquirierten Zählraten wurden für die quantitative Datenanalyse in Microsoft Office Excel (*Microsoft Office 2007 V2, Microsoft Corporation, Washington Amerika*) eingegeben. So konnte jeder individuelle Spine, der in die Analyse einging, über die Zeit hinweg in wiederholten Aufnahmen verfolgt werden.

2.9.2 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism (*GraphPad Prism Software Version 8, Inc.*) verwendet. Die Gruppen der Genotypen sind in allen Graphen wie aus Tabelle 3 zu entnehmen mit entsprechenden Kürzeln abgekürzt.

Die Gruppen $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$, $CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$, $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ und $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ wurden im Alter von etwa vier Monaten das erste Mal einer 2-Photonen-Bildgebung unterzogen. Durch die Zählung von Spines an Dendriten konnte so die Spinedichte bestimmt werden.

Tab.: 3 Abkürzungen der Genotypen in Abbildungen

Genotyp	Abkürzung
$CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$	C
$CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$	CC
$APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$	T
$APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$	TT
$3xTgAD::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$	X
$3xTgAD::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$	XX

Durch eine Wiederholung der Bildgebung im Alter von sieben Monaten konnte auch der Spineverlust bestimmt werden (siehe Abb. 9). Außerdem konnte aufgrund der A β -Plaquezunahme eine vergleichende Zählung in Plaque-Nähe (< 25 μ m Abstand) und Plaque-Ferne (> 25 μ m Abstand) vorgenommen werden.

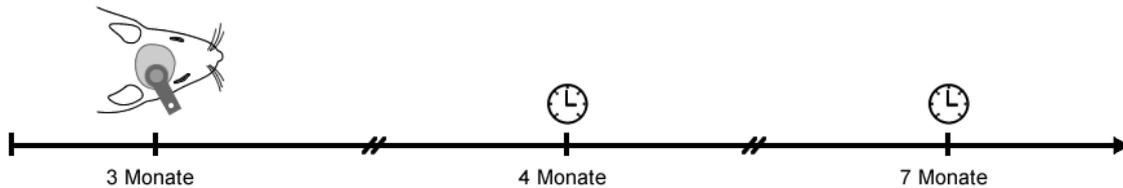


Abb. 9: Zeitlicher Ablauf der Serien-Aufnahmen

Implantation des kranialen Fensters im Alter von drei Monaten. Bei vier und sieben Monaten wurde eine Zeitserie (Uhren Symbol) durchgeführt.

Waren ganze Teile eines Dendriten – von mindestens 5 μ m - vom Verlust betroffen, so wurde dies als Dendritenverlust definiert.

Die beiden Gruppen $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ und $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ erhielten ihre erste Bildgebung im Alter von etwa 20 Monaten.

Von allen Gruppen wurden sowohl einzelne Bilderstapel, als auch ganze Zeitserien erstellt. Diese bestanden aus sieben Bilderstapeln, welche in einem Abstand von fünf Minuten erstellt wurden. Die Zeitserien dienten der Analyse von Filopodienbewegungen der Mikroglia. Es wurde ermittelt, wie oft die gezählten Spines von Filopodien berührt wurden. Daraus wurde eine Berührungsrates pro Stunde ermittelt.

Im Folgenden beziehen sich alle berechneten Werte auf je fünf Mäuse in den Gruppen $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ und $CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ sowie je vier Mäuse in den Gruppen $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$, $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$, $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ und $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$. Für jede Maus sind fünf Dendriten mit den dazugehörigen Spines in die Zählung eingegangen.

In den Gruppen $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ und $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ wurden darüber hinaus fünf weitere Dendriten mit Spines gezählt, welche sich in unmittelbarer Nähe (also einem Abstand von $< 25 \mu m$) eines A β -Plaques befanden.

Alle Datensätze wurden auf Normalverteilung unter Verwendung des Kolmogorow-Smirnow-Tests überprüft. Die statistische Analyse gelang über einfache Varianzanalysen (oneWay ANOVA) und den ungepaarten Student'schen t-Test. Die Mittelwerte der Testgruppen werden mit dem Standardfehler (SEM), der Test-Art, der Gruppengröße „n“ und dem Signifikanzniveau ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$ und $p < 0,001 = ***$) angegeben.

2.9.3 Berechnung der Berührungsrates von Mikroglia

Die Berührungsrates wurden anhand der Zeitserien erstellt. Dabei wurden sieben Bilderstapel in fünf Minuten Abständen erstellt. Die Fluoreszenzen für YFP und GFP wurden simultan aufgenommen. Diese Kanäle für YFP und GFP konnten mit Hilfe der ZEN Software übereinandergelegt werden und es wurde eine Kollokalisationsanalyse durchgeführt. Überlappende Signale konnten durch das Programm farblich hervorgehoben werden. Dies geschah dann, wenn sich ein Filopodium in unmittelbarer Nähe zu einem Spine befand.

Um nicht fälschlich Hintergrundsignale als Berührung einzuordnen, wurden definierte Kriterien angewandt. So musste sich die Überlappung der Signale über mindestens fünf übereinander gereichte Bilder erstrecken (entsprechend $5 \mu m$ Schnitten). Außerdem musste der Mikrogliafortsatz als solcher kohärent zu erkennen sein.

Die Berührungsrates BR wurde anhand der Zahl der Berührungen B in sieben Bilderstapeln durch die Zahl der gezählten Spines wie folgt berechnet und auf eine Stunde normiert.

$$BR \left[\frac{1}{h} \right] = \frac{B}{Spine * 7} * 12$$

3. Ergebnisse

3.1 Spinedichten

Um die Relevanz des *CX3CR1*-Genotyps für die Dichte der Spines zu untersuchen, wurden vier verschiedene Mausgruppen miteinander verglichen. Hierzu wurden homo- und heterozygote *CX3CR1*-GFP Mäuse verglichen mit APP/PS1 Mäusen mit homo- und heterozygotem *CX3CR1*-Genotyp. Zur Visualisierung der Spines wurde *Thy1*-YFP-h eingekreuzt. Somit ergaben sich die Genotypen:

- *CX3CR1*^{GFP/wt}::*Thy1*^{YFP/wt}
- *CX3CR1*^{GFP/GFP}::*Thy1*^{YFP/wt}
- *APP*_{swe}/*PS1*::*CX3CR1*^{GFP/wt}::*Thy1*^{YFP/wt}
- *APP*_{swe}/*PS1*::*CX3CR1*^{GFP/GFP}::*Thy1*^{YFP/wt}.

Außerdem wurden für die Gruppen *3xTgAD*::*CX3CR1*^{GFP/wt}::*Thy1*^{YFP/wt} und *3xTgAD*::*CX3CR1*^{GFP/GFP}::*Thy1*^{YFP/wt} im Alter von 20 Monaten Spine-Aufnahmen erstellt, um die Dichten in einem tripel transgenen AD-Modell zu ermitteln.

Der statistische Vergleich gelang mittels oneWay ANOVA. Im Einzelnen fanden sich bei vier Monaten Spinedichten von $0,92 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ für *CX3CR1*^{GFP/wt}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 25 Dendriten, 5 Mäuse), von $0,95 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ für *CX3CR1*^{GFP/GFP}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 25 Dendriten, 5 Mäuse), von $0,94 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ für *APP*_{swe}/*PS1*::*CX3CR1*^{GFP/wt}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 20 Dendriten, 4 Mäuse) und von $0,88 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ für *APP*_{swe}/*PS1*::*CX3CR1*^{GFP/GFP}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 20 Dendriten, 4 Mäuse) (siehe Abb. 10A-B). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

Auch im Alter von sieben Monaten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) bei Spinedichten von $0,90 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ für *CX3CR1*^{GFP/wt}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 25 Dendriten, 5 Mäuse), von $0,91 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$ für *CX3CR1*^{GFP/GFP}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 25 Dendriten, 5 Mäuse), von $0,88 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$ für *APP*_{swe}/*PS1*::*CX3CR1*^{GFP/wt}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 20 Dendriten, 4 Mäuse) und von $0,86 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ für *APP*_{swe}/*PS1*::*CX3CR1*^{GFP/GFP}::*Thy1*^{YFP/wt} (n = 20 Dendriten, 4 Mäuse) (siehe Abb. 10C-D).

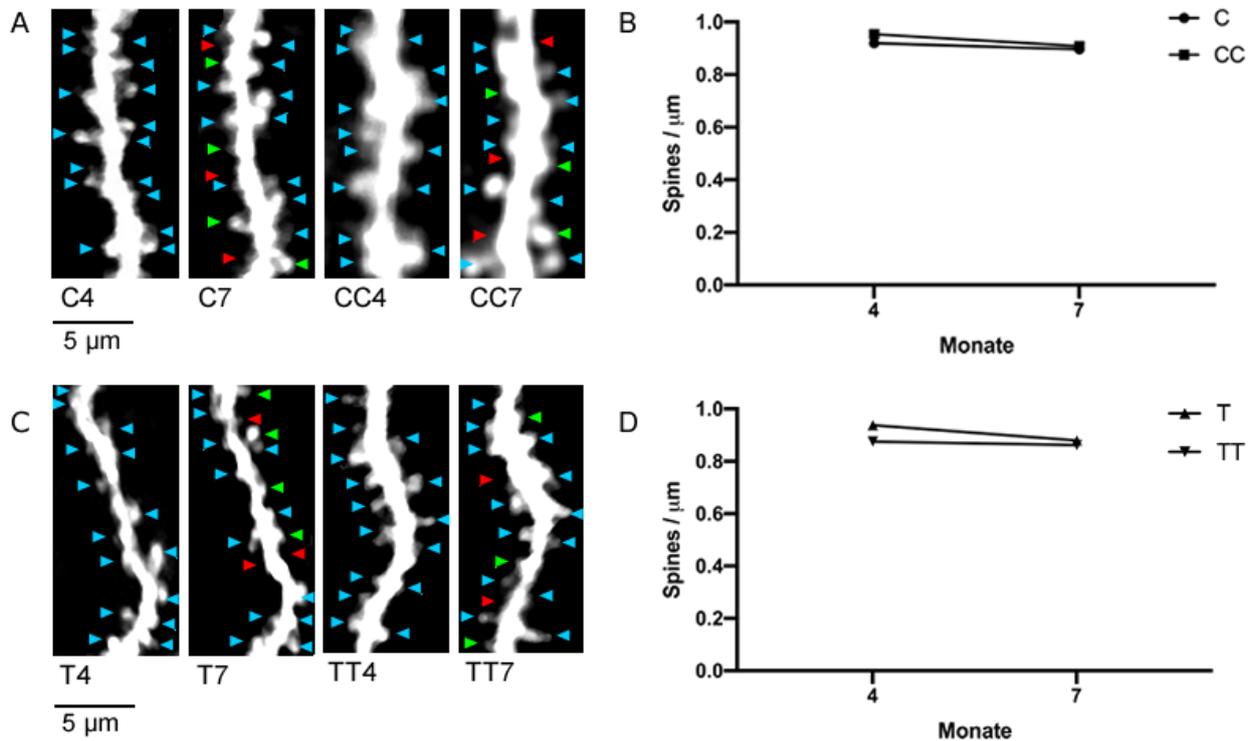


Abb. 10: Spinedichten in AD-ähnlichen Mauslinien und Kontrollgruppen

A Dendriten der Mauslinien *CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* (C4 = bei vier und C7 = bei sieben Monaten)

und *CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* (CC4 = bei vier und CC7 = bei sieben Monaten). Blaue Pfeile = persistierende Spines, grüne Pfeile = neue Spines, rote Pfeile = verschwundene Spines.

B Für C und CC gibt es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des *CX3CR1*-Genotyps oder des Alters. oneWay ANOVA, jeweils n = 25 Dendriten pro Gruppe, 5 Mäuse pro Gruppe, p > 0,05.

C Dendriten der Mauslinien *APP^{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* (T4 = bei vier und T7 = bei sieben Monaten) und *APP^{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* (TT4 = bei vier und TT7 = bei sieben Monaten). Blaue Pfeile = persistierende Spines, grüne Pfeile = neue Spines, rote Pfeile = verschwundene Spines.

D Für T und TT gibt es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des *CX3CR1*-Genotyps oder des Alters. oneWay ANOVA, jeweils n = 20 Dendriten pro Gruppe, 4 Mäuse pro Gruppe, p > 0,05.

Siehe Anhang 1 für beispielhafte Übersichtsbilder.

Die Spinedichte Unterschiede in Plaque-Nähe – also in einem Radius von < 25 μm – waren in der Gruppe *APP^{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* am stärksten ausgeprägt. Die Spinedichten in Aβ-Plaque Nähe lagen bei sieben Monaten bei $0,39 \pm 0,05 \mu\text{m}^{-1}$ für *APP^{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* (n = 20 Dendriten, 4 Mäuse) und bei $0,58 \pm 0,05$

μm^{-1} für $APP_{\text{swe}}/PS1::CX3CR1^{\text{GFP/GFP}}::Thy1^{\text{YFP/wt}}$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse), wobei sich im Student'schen t-Test eine Signifikanz von $p = 0,0005$ ergab (siehe Abb. 11).

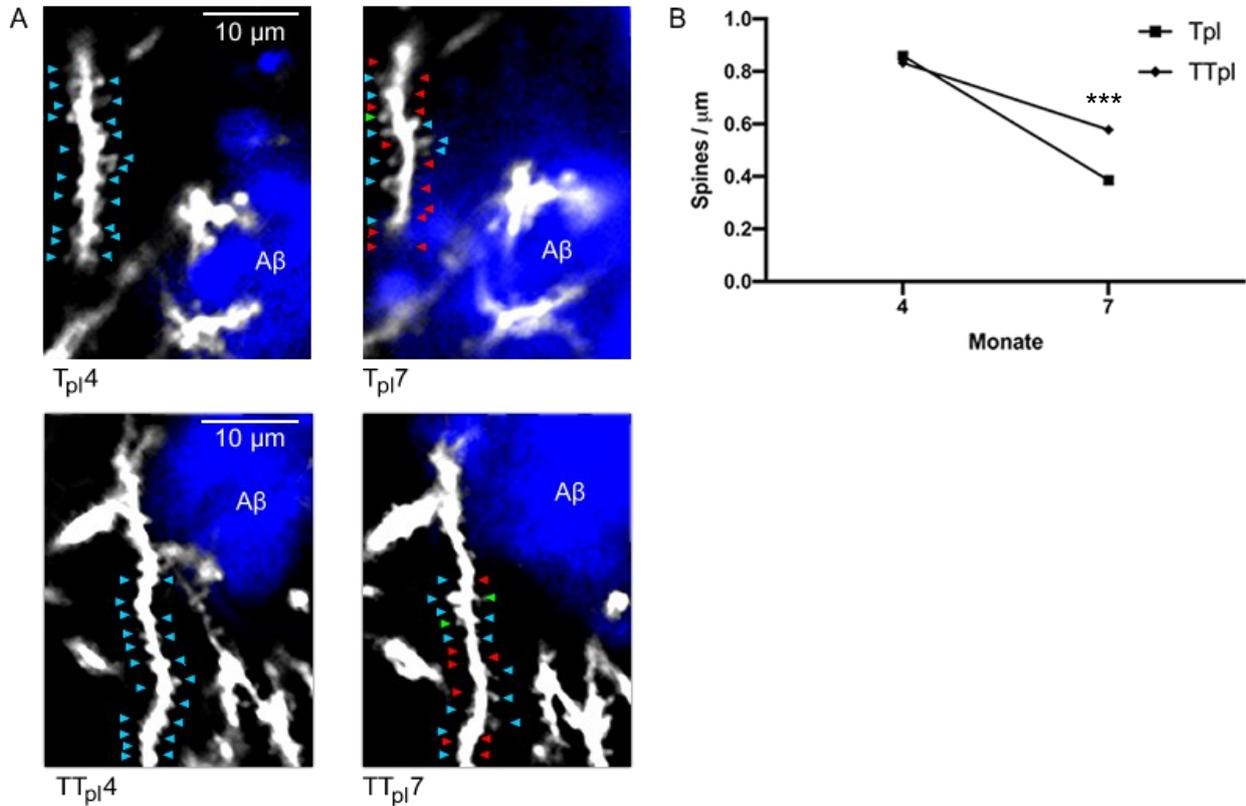


Abb. 11: Spinedichten im AD-ähnlichen Mausmodell am Aβ Plaque

A Dendriten der beiden Mauslinien $APP_{\text{swe}}/PS1::CX3CR1^{\text{GFP/wt}}::Thy1^{\text{YFP/wt}}$ (bei $T_{\text{pl}4}$ = vier und $T_{\text{pl}7}$ = sieben Monaten) und $APP_{\text{swe}}/PS1::CX3CR1^{\text{GFP/GFP}}::Thy1^{\text{YFP/wt}}$ (bei $TT_{\text{pl}4}$ = vier und $TT_{\text{pl}7}$ = sieben Monaten). Die Dendriten befinden sich innerhalb eines 25 μm Radius vom Aβ-Plaque-Rand.

B Hochsignifikanter Abfall der Spinedichten bei sieben Monaten, insbesondere in der Gruppe $APP_{\text{swe}}/PS1::CX3CR1^{\text{GFP/wt}}::Thy1^{\text{YFP/wt}}$. Student'scher t-Test, $n = 20$ Dendriten pro Gruppe, 4 Mäuse pro Gruppe; $p = 0,0005$.

Somit ergibt sich, dass im AD-ähnlichen Mausmodell die Mäuse, die CX3CR1 noch exprimieren, eine deutlich geringere Spinedichte im Alter von sieben Monaten aufweisen, als die Mäuse, die eine CX3CR1-Defizienz besitzen.

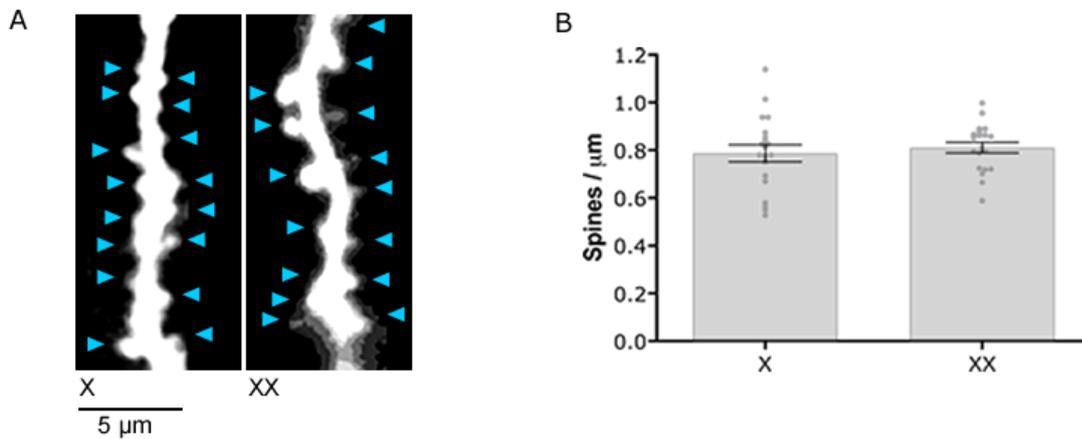


Abb. 12: Spinedichten in 3xTgAD Mäusen im Alter von 20 Monaten

A Dendriten der Mauslinien $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ (X) und $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ (XX) im Alter von 20 Monaten. Blaue Pfeile = Spines.

B Spinedichten ohne signifikante Unterschiede. Student'scher t-Test, $n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse, $p > 0,05$.

Für die 3xTgAD-Mäuse fanden sich im Alter von 20 Monaten keine signifikanten Unterschiede im Student'schen t-Test ($p = 0,57$) für die Spinedichten bei Werten von $0,79 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$ für $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse) und von $0,81 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ für $3xTgAD::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse) (siehe Abb. 12).

3.2 Spineverluste

Bei der Betrachtung der Spines nach vier Monaten konnte beobachtet werden, welche Spines verloren waren.

Die Spineverluste ergaben für $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ $3,6 \pm 0,7 \%$ ($n = 25$ Dendriten, 5 Mäuse), für $CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ $5,5 \pm 1,3 \%$ ($n = 25$ Dendriten, 5 Mäuse), für $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ $6,1 \pm 2,0 \%$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse) und für $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ $2,2 \pm 0,8 \%$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse). Im oneWay ANOVA ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

Für $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ ergab sich ein Spineverlust von $59,7 \pm 6,2 \%$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse) und für $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ ergab sich ein Spineverlust von nur $29,6 \pm 5,5 \%$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse). Im Student'schen t-Test ergab sich dabei eine Signifikanz von $p < 0,0001$.

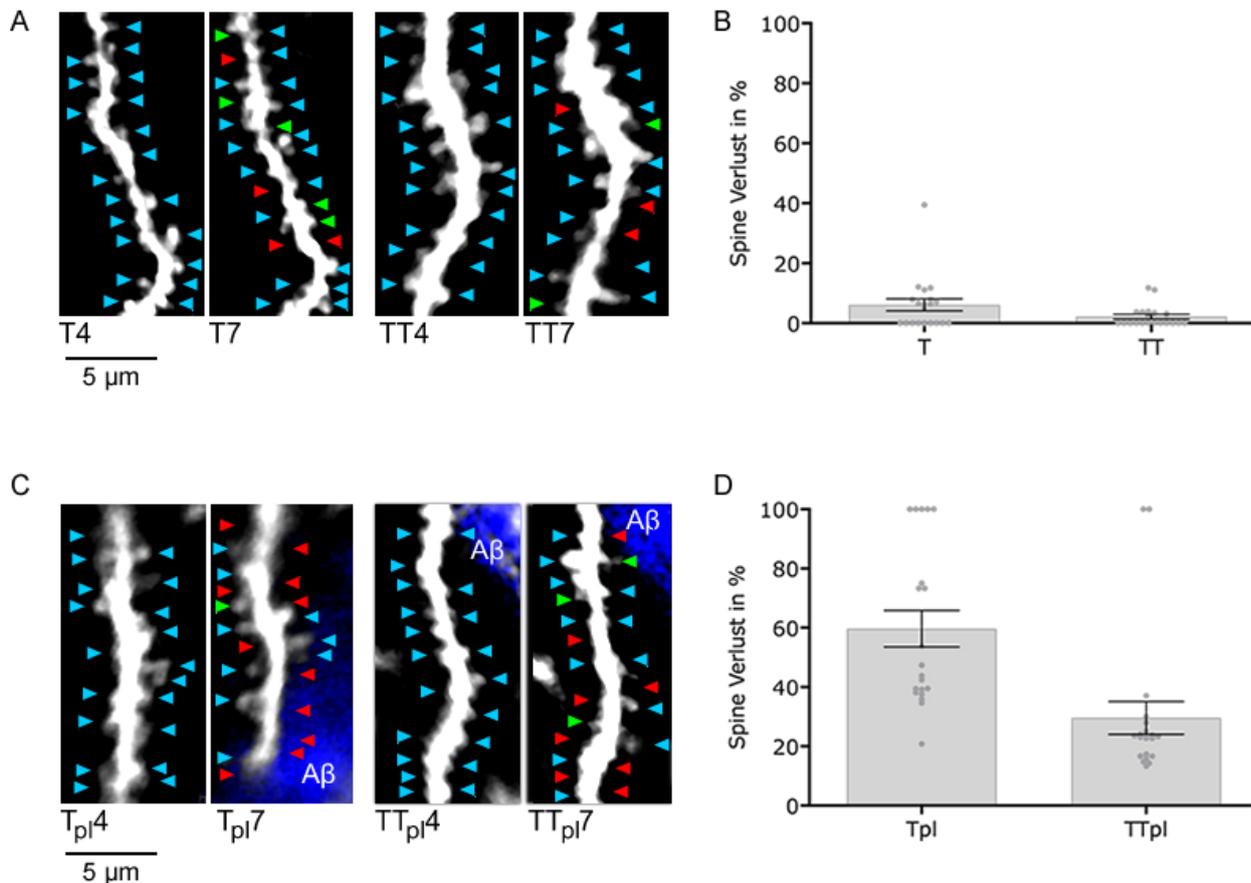


Abb. 13: Spine Verluste im AD-ähnlichen Mausmodell an A β -Plaques

A Dendriten der Mauslinien $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ (T4 = bei vier und T7 = bei sieben Monaten) und $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ (TT4 = bei vier und TT7 = bei sieben Monaten). Blaue Pfeile = persistierende Spines, grüne Pfeile = neue Spines, rote Pfeile = verschwundene Spines.

B Für T und TT gibt es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des $CX3CR1$ -Genotyps oder des Alters hinsichtlich der Spineverluste. Student'scher t-Test, $n = 20$ Dendriten pro Gruppe, 4 Mäuse pro Gruppe, $p > 0,05$.

C Dendriten in A β -Plaque Nähe ($< 25 \mu\text{m}$ Radius) der Mauslinien $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ (T_{pl}4 = bei vier und T_{pl}7 = bei sieben Monaten) und $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ (TT_{pl}4 = bei vier und TT_{pl}7 = bei sieben Monaten). Blaue Pfeile = persistierende Spines, grüne Pfeile = neue Spines, rote Pfeile = verschwundene Spines.

D Für T_{pl} und TT_{pl} gibt es einen hochsignifikanten Unterschied der Spineverluste. Student'scher t-Test, $n = 20$ Dendriten pro Gruppe, 4 Mäuse pro Gruppe, $p < 0,0001$.

Somit ergibt sich, dass eine CX3CR1-Defizienz den Spineverlust an A β -Plaques im AD-ähnlichen Mausmodell signifikant verringert.

3.3 Dendritenverlust

Die folgende Auswertung betrachtet den Verlust von Dendritenteilen bzw. den Verlust ganzer Dendriten gemessen in Absolutzahlen in Mikrometer und in Prozent von der gemessenen Länge in μm . Hintergrund dieser Analyse war ein auffälliger Verlust von teilweise kompletten Dendritenästen in A β -Plaques Nähe, welcher mittels genauer Ausmessung der Dendritenlänge quantifiziert werden sollte. Die zugrundeliegende Vermutung ist, dass der CX3CR1-Rezeptorgenotyp für den strukturellen Abbau nicht nur von Spines, sondern auch von ganzen Dendritenteilen verantwortlich ist.

In den Gruppen *CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* und *CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* gab es keine Dendritenverluste. In den Gruppen *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* und *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* gab es außerhalb eines Radius von 25 μm keine Dendritenverluste. Innerhalb eines Radius von 25 μm waren jedoch Verluste von Dendriten auffällig:

Die Gruppe *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* zeigte in A β -Plaques Nähe einen Dendritenverlust von durchschnittlich $13,3 \pm 2,8 \mu\text{m}$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse pro Gruppe). Prozentual ergab sich ein Dendritenverlust von $39,1 \pm 8,9 \%$.

Die Gruppe *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* zeigte einen Dendritenverlust von $3,3 \pm 1,4 \mu\text{m}$ ($n = 20$ Dendriten, 4 Mäuse pro Gruppe). Prozentual ergab dies einen Dendritenverlust von $14,4 \pm 6,8 \%$.

Im Student'schen t-Test ergab sich ein Signifikanzniveau von $p = 0,0028$ (siehe Abb. 14).

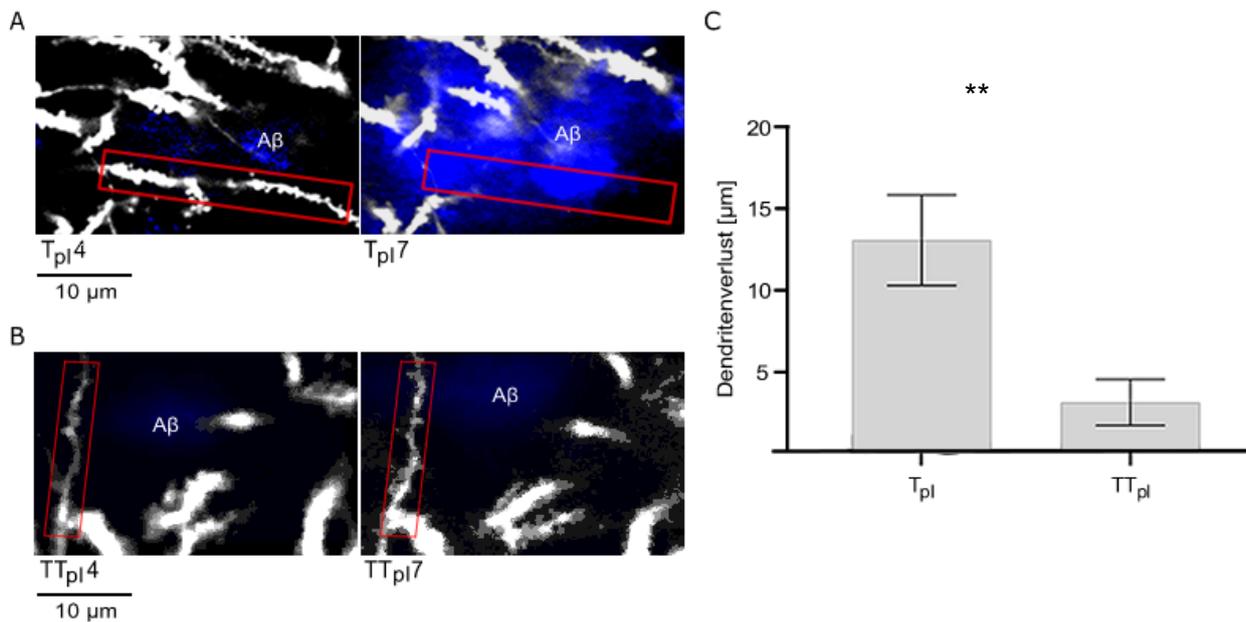


Abb. 14: Dendritenverlust im AD-ähnlichen Mausmodell in Aβ-Plaques Nähe

A Dendrit einer *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* Maus in der Nähe eines Aβ-Plaques (< 25 μm Radius), die linke Aufnahme wurde im Alter von vier und die rechte im Alter von sieben Monaten erstellt. Mit einem roten Rechteck ist der Dendrit markiert, der in der zweiten Messung vollständig verschwunden ist. Der Aβ-Plaques zeigt sich in blau.

B Dendrit einer *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* Maus in der Nähe eines Aβ-Plaques (< 25 μm Radius), die linke Aufnahme wurde im Alter von vier und die rechte im Alter von sieben Monaten erstellt. Mit einem roten Rechteck ist der Dendrit markiert, der über den Zeitraum beobachtet wurde.

C Dendritenverlust in μm in Nähe von Aβ-Plaques (Radius < 25 μm). Student'scher t-Test, n = 20 Dendriten pro Gruppe, 4 Mäuse pro Gruppe, p = 0,0028. Siehe Anhang 2 für beispielhafte Übersichtsbilder.

Diese Resultate weisen darauf hin, dass die CX3CR1-Defizienz den in der Nähe von Aβ-Plaques auftretenden Dendritenverlust signifikant vermindert. Somit konnte gezeigt werden, dass der *Cx3cr1*-Genotyp in signifikanter Weise mit dem Dendritenverlust in Aβ-Plaques Nähe korreliert.

3.4 Berührungsrates von Mikroglia

Da bekannt ist, dass Mikroglia mit Ihren Fortsätzen das zelluläre Umfeld nach pathologischen Reizen abtasten und mit einer Änderung ihres morphologischen Zustandes reagieren (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn, Kirchhoff and Helmchen, 2005) liegt eine Betrachtung der Berührungsrates von Mikrogliafortsätzen an Spines nahe. Die Frage, die sich dabei stellt, ist, inwieweit die Berührungsrates vom *CX3CR1*-Genotyp sowie von A β -Plaques abhängt.

Dabei wurden mittels 2-Photonen-*in vivo*-Mikroskopie YFP und GFP Bilderstapel mit 1 μ m Abstand erstellt. So erhielt man eine Bilderserie eines Gewebestücks. Diese Aufnahmen wurden jeweils sieben Mal wiederholt mit einem Abstand von 5 Minuten. Mit der ZEN Software gelang es, die GFP und YFP Kanäle überlappen zu lassen, sodass man eine Berührung zwischen Neuron und Mikrogliafortsatz als Überschneidung der YFP und GFP Signale darstellen konnte. So gelang es, die zuvor analysierten Dendriten zu relokalisieren, und in den Bilderstapeln die Häufigkeit der Berührungen mit Mikrogliafortsätzen zu zählen und diese über die Zeit zu mitteln.

Die Gruppen *CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* ($0,68 \pm 0,22$ B/Spine/h, n = 25 Dendriten, 5 Mäuse pro Gruppe), *CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* ($1,14 \pm 0,20$ B/Spine/h, n = 25 Dendriten, 5 Mäuse pro Gruppe), *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* ($1,06 \pm 0,29$ B/Spine/h, n = 20 Dendriten, 4 Mäuse pro Gruppe) sowie *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* ($0,52 \pm 0,17$ B/Spine/h, n = 20 Dendriten, 4 Mäuse pro Gruppe) zeigten untereinander in einer einfachen Varianzanalyse keine signifikanten Unterschiede.

Für die Berührungsrates (BR) in A β -Plaque Nähe (also innerhalb eines 25 μ m Radius) zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}* ($5,95 \pm 0,60$ B/Spine/h, n = 20 Dendriten, 4 Mäuse pro Gruppe) sowie *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* ($1,06 \pm 0,45$ B/Spine/h, n = 20 Dendriten, 4 Mäuse pro Gruppe) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,0001$ (oneWAY ANOVA).

Somit ergibt sich aus diesem Resultat, dass die Berührungsrates von Mikroglia an Spines im AD-ähnlichen Mausmodell bei funktionierendem *CX3CR1* signifikant erhöht ist. Eine *CX3CR1*-Defizienz korreliert hingegen mit einer nahezu normalisierten Berührungsrates an Spines.

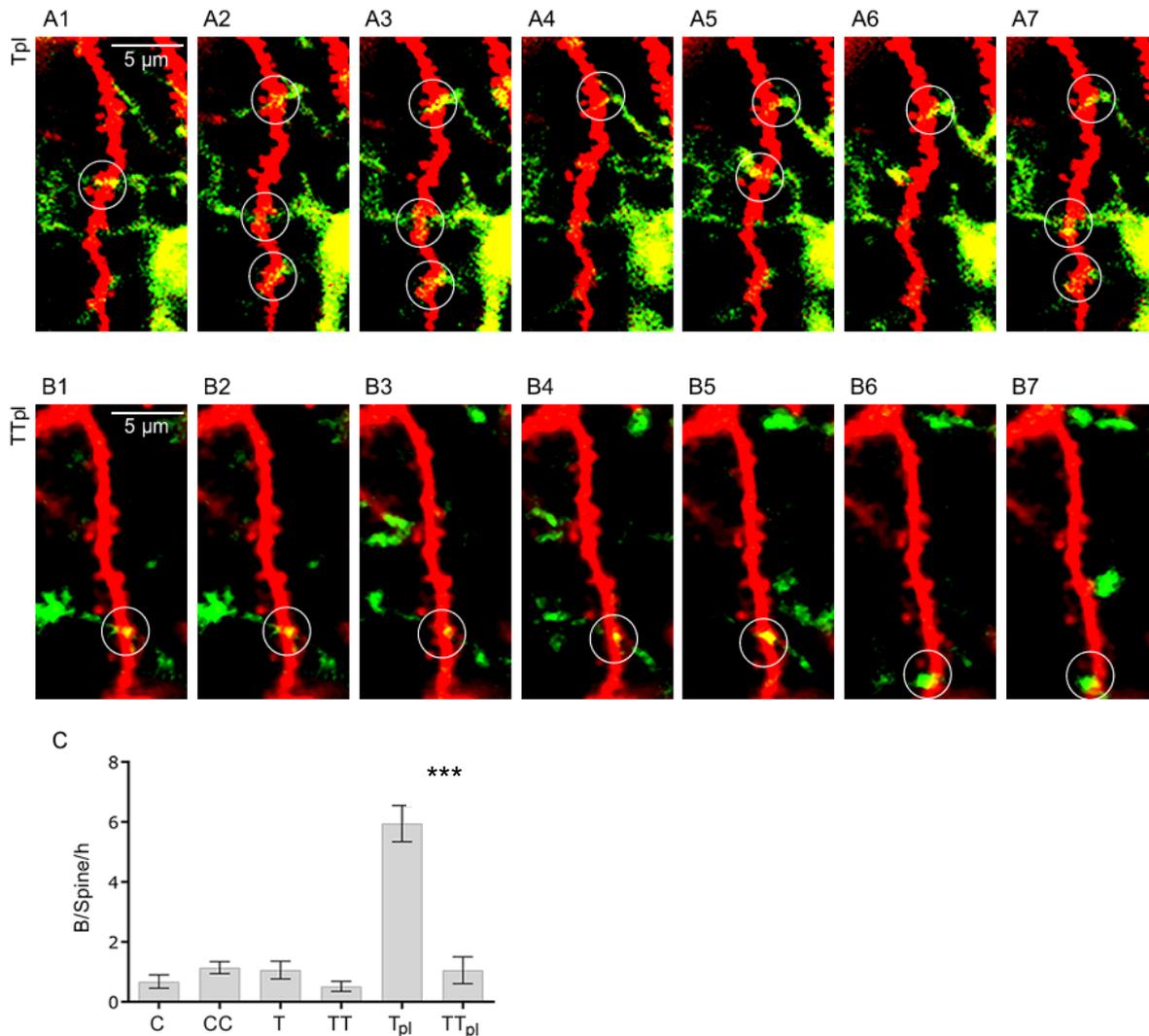


Abb. 15: Mikroglia Berührungsrates im AD-ähnlichen Mausmodell

A 1-7 Dendrit (in rot) einer $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ Maus, in Aβ-Plaques Nähe (< 25 μm Radius). Mikroglia = grün, weiße Kreise markieren Berührungspunkte (gelbe Signale) von Mikroglia Filopodien zu Spines. Bilderserie als Zeitserie erstellt im Abstand von je fünf Minuten.

B 1-7 Dendrit (in rot) einer $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ Maus, in Aβ-Plaques Nähe (< 25 μm Radius). Legende wie bei A 1-7.

C Berührungsrates in Berührungen pro Spine pro Stunde. $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ = C, $CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ = CC, $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ = T, $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ = TT. oneWay ANOVA, in C und CC je n = 25 Dendriten und 5 Mäuse pro Gruppe, in T und TT je n = 20 Dendriten und 4 Mäuse pro Gruppe, p > 0,05.

Aβ-Plaques nahe Dendriten (< 25 μm Radius): $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ = T_{pl} und $APP_{Swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ = TT_{pl}. oneWay ANOVA, je n = 20 Dendriten, 4 Mäuse pro Gruppe, p < 0,0001. Siehe Anhang 3 für beispielhaftes Übersichtsbild.

4. Diskussion

Die Pathologie der AD gibt der Wissenschaft immer noch Rätsel auf. Es gibt zahlreiche Hinweise für die Wichtigkeit des CX3CR1 für die Interaktion zwischen Mikroglia und dem zellulären Umfeld bei der AD. Deswegen befasste sich diese Arbeit mit den Zusammenhängen zwischen dem CX3CR1-Genotyp in Plaque-Nähe und Respektive der Dichte und dem Verlust von Spines und Dendriten sowie der Berührungsrate von Mikroglia. Mittels hochauflösender 2-Photonen-*in vivo*-Mikroskopie konnten die dendritischen Strukturen dargestellt und über mehrere Monate hinweg beobachtet und somit die Zusammenhänge im Mausmodell analysiert werden.

4.1 Dichte und Verlust von Spines und Dendriten

Die Spinedichte stellt ein Maß für die synaptische Vernetzungsfähigkeit eines neuronalen Netzes dar. Eine Abnahme der Dichte lässt sich bereits mit zunehmendem Alter beobachten (Jacobs, Driscoll and Schall, 1997; Peters, Sethares and Moss, 1998; Duan *et al.*, 2003; Peters, Sethares and Luebke, 2008). Bei der AD geht die neuronale Degeneration jedoch über den altersbedingten Abbau hinaus. Die neurotoxische Wirkung von A β gilt als einer der maßgeblichen Faktoren hierfür (Billingsley and Kincaid, 1997; Ono, Condrón and Teplow, 2009; Rosenmann *et al.*, 2012; Baranello *et al.*, 2015).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in A β -Plaque Nähe sowohl der Spineverlust erhöht als auch die Spinedichte erniedrigt ist. Bemerkenswert ist, dass die CX3CR1 Defizienz mit einer höheren Spinedichte und einem niedrigeren Spineverlust korreliert. Diese Effekte sind in A β -Plaque Nähe hochsignifikant ausgeprägt. Auch an ganzen Dendritenteilen in A β -Plaque Nähe korrelierte die CX3CR1 Defizienz mit einem Erhalt von Dendriten. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass der Rezeptor den Abbau begünstigt oder womöglich ausschlaggebend unterhält.

Fraglich ist, ob die Spines und Dendriten, welche in Plaque Nähe abgebaut werden, überhaupt noch eine Restfunktion erfüllen – oder ob sie vielleicht sogar pathologische Signalmuster produzieren. Hierzu haben Kuchibhotla *et al.* im Jahre 2008 gefunden, dass die Calcium-Konzentration in Spines transgener AD-Mäuse bei Vorhandensein von A β -Plaques erhöht war (Kuchibhotla *et al.*, 2008). Dabei korrelierte die Erhöhung der Calcium-Konzentration mit der Nähe zu den A β -Plaques. Eine nachweisbare Folge der

gestörten Calcium-Homöostase waren veränderte, morphologische Eigenschaften von Neuriten.

Ebenso konnte 2017 in Wildtyp-Mäusen nach kortikaler Applikation von löslichen A β -Oligomeren *in vivo* nachgewiesen werden, dass die Calcium-Homöostase in Neuronen gestört und am Folgetag ein Abbau von Spines zu beobachten war (Arbel-Ornath *et al.*, 2017). Somit scheint die Störung des Calcium-Haushalts in Zusammenhang mit der Exposition zu A β -Spezies zu stehen und einen neuronalen Abbau und elektrophysiologische Störungen zu verursachen. Andere Hinweise für eine elektrophysiologische Dysfunktionalität konnten ebenfalls erbracht werden:

Beker *et al.* zeigten 2012 und 2016 in verschiedenen Publikationen (Beker *et al.*, 2012, 2016), dass APP/PS1 transgene Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen dysfunktionale elektrophysiologische Kortexaktivität aufweisen. Dabei führten sie *in vivo* intrazelluläre Messungen der Zellpotentiale durch und fanden, dass die Depolarisierungsphasen wesentlich kürzer waren, und dass Aktivierungen aus der Depolarisationsphase heraus signifikant häufiger fehlschlagen. Darüber hinaus unterschieden sich die kortikalen Signalfrequenzen und Signalformen der transgenen Mäuse von denen der Wildtyp Kontrollen. Sie analysierten sogenannte lokale Feldpotentiale: dabei wird im Prinzip eine elektroenzephalografische Ableitung eines Summenpotentials über ein definiertes Hirnareal aufgezeichnet. Auch hierbei konnten wesentliche Veränderungen in der kortikalen Hirnaktivität der transgenen Mäuse aufgezeigt werden. Die Veränderungen im Summenpotential können durch den strukturellen Abbau und die elektrophysiologische Dysfunktion in A β Nähe erklärt werden. Dies könnte ein Grund für die erhöhte Epileptogenität bei AD Patienten sein (Andreas Hufschmidt, Carl Hermann Lücking, Sebastian Rauer, 2017).

Fraglich ist also, ob ein Abbau der neuronalen Strukturen nicht auch die Funktion erfüllt, epileptogene Signale pathologisch veränderter neuronaler Strukturen zu unterbinden. Ein Erhalt der Spines und Dendriten in Plaque-Nähe könnte dann sogar negative Auswirkungen für das neuronale Netz haben – und der CX3CR1-Rezeptor letztlich sogar eine protektive Funktion erfüllen. Um Einsicht in diese Fragestellung zu gewinnen, wären weitere Experimente notwendig.

In erster Linie sollten Verhaltensexperimente angeschlossen werden. Dabei könnten vor allem Lernexperimente mit positiver Verstärkung Aufschluss über Kurz- und Langzeitgedächtnisfunktion geben. Besonders interessant wäre hier, ob die CX3CR1-Rezeptor Defizienz in der *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* Gruppe eine signifikante Auswirkung auf das Lernverhalten hätte, und ob respektive eine Korrelation zu Verlust von Spines und Dendriten in Aβ-Plaques Nähe nachgewiesen werden könnte. Wenn beispielsweise die *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* Gruppe erlerntes Verhalten nach einer definierten Zeitspanne besser abrufen könnte, dann wäre dies ein Hinweis dafür, dass der CX3CR1-Rezeptor in Aβ-Plaques Nähe den Abbau von Strukturen begünstigt, welche noch in das umliegende neuronale Netz funktionell integriert sind. Eine Defizienz des Rezeptors würde dann bedeuten, dass Spines und Dendriten in Aβ-Plaques Nähe verschont würden und somit eine bessere Leistung im Lernexperiment erzielt werden könnte. Denkbar ist jedoch auch, dass die Mäuse der *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}* Gruppe vermehrt an epileptischen Anfällen leiden würde, oder dass sie nicht signifikant besser als die Kontrollgruppen im Lernexperiment abschneiden würden. Das könnte damit erklärt werden, dass die Spines und Dendriten in Aβ-Plaques Nähe durch ihre gestörten Signaleigenschaften epileptogene Signale produzieren bzw. keine funktionale Integrität mit dem umliegenden neuronalen Netz mehr aufweisen.

4.2 Berührungsrates von Mikroglia

Der CX3CR1 ist ein mikroglialer Chemokin Rezeptor, welcher die mikrogliale Motilität beeinflusst (Liang *et al.*, 2009). Er ist extrazellulär gerichtet in der Zellmembran lokalisiert und wird durch einen von Neuronen exprimierten Liganden, CX3CL1, aktiviert (Cardona *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass der CX3CR1 Rezeptor für neurodegenerative Prozesse eine entscheidende Rolle beim Abbau neuronaler Strukturen spielt, da seine Defizienz mit der Phagozytose Fähigkeit von Mikroglia sowie mit der Aβ-Plaques Last korreliert (Lee *et al.*, 2010). Außerdem konnte die CX3CR1-Defizienz mit einer höheren Überlebensrate kortikaler Neurone im 3xTgAD Modell korreliert werden (Fuhrmann *et al.*, 2010).

Eine wichtige Korrelation, welche in dieser Arbeit belegt werden konnte, liegt in der Berührungsrate und der Spinedichte. Eine Signifikanz ließ sich in dieser Studie in A β -Plaque Nähe bei CX3CR1-defizienten Mäusen zeigen. Dabei ist die Berührungsrate in Abwesenheit des Rezeptors in A β -Plaque Nähe erniedrigt. Der Ligand CX3CL1 kommt auf Neuronen vor, wobei Rezeptor defiziente Mikroglia Neurone nicht mehr erkennen und abbauen können.

Fuhrmann et al. untersuchten 2010 im murinen AD Modell mit Hilfe von 2-Photonen-*in vivo*-Mikroskopie die Bewegungen von Mikrogliafortsätzen an Neuronen. Hierbei konnten sie bei 3xTgAD Mäusen mit einer CX3CR1-Defizienz feststellen, dass weniger Neurone vom Abbau betroffen waren, als in AD Mäusen, welche den Rezeptor noch exprimierten. Fraglich ist, ob dieser Abbau nur dysfunktionale Neurone betraf oder möglicherweise auch solche, welche noch in das neuronale Netz funktional integriert waren. Dabei ist dies ein denkbar entscheidender Punkt in der Entschlüsselung des Problems der AD. Wenn Mikroglia durch den Einfluss von A β -Plaques das eigene neuronale, noch funktionierende Umfeld schädigen, würde dies den Progress der AD Pathologie nicht nur zulassen, sondern ihn gar unterhalten. Eine Unterdrückung der Berührungsrate von Mikroglia zu neuronalen Strukturen wäre dann ein therapeutischer Ansatzpunkt.

4.3 Herausforderungen und Schlussfolgerung

Die weitere Erforschung der Frage, ob der CX3CR1-Rezeptor eine schädigende Wirkung im AD Modell besitzt oder nicht, ist jedoch ein schwieriges Unterfangen:

Entsprechende Experimente müssten zum einen repetitive Bildaufnahmen *in vivo* über einen Zeitraum von mehreren Monaten vorsehen (wie in dieser Studie durchgeführt) und zum anderen die Versuchstiere einem Lernexperiment unterziehen. Zusätzlich müsste nach Abschluss der Verhaltensanalyse noch eine elektrophysiologische Messung erfolgen. Beispielsweise könnten in akuten Hirnschnitten Patch-Clamp Messungen durchgeführt werden: hierbei könnten die „überlebenden“ Neurone und deren Dendriten im CX3CR1-defizienten AD-ähnlichem Mausmodell auf ihre elektrophysiologische Funktionstüchtigkeit (Schwellenwert, Morphologie der Aktionspotentiale, ...) getestet werden. Zeitgleich könnten auch gezielt die Dendritenteile für die elektrophysiologischen Messungen anvisiert werden, welche besonders hoch- bzw. niederfrequent von Mikrogliafortsätzen berührt wurden. Die Frage dabei wäre also, ob Mikroglia durch das

Abtasten von Dendriten und Spines auch deren elektrophysiologischen Eigenschaften verändern.

Bei einem derartigen experimentellen Design gibt es jedoch viele Herausforderungen: für das Verhaltensexperiment muss eine größere Tieranzahl benutzt werden (beispielsweise zehn Tiere pro Gruppe). Damit verbunden ist jedoch auch eine immense Datenmenge. Die Analyse von Spines und Dendriten ist darüber hinaus sehr zeitaufwendig. Außerdem muss durch Projektionen bzw. Auswertung mehrerer Schichtaufnahmen und unter Berücksichtigung von „Rauschsignalen“ zwischen Spines und „Hintergrund“ unterschieden werden. Durch Pulsation von umliegenden Gefäßen und durch die Atemexkursionen des anästhesierten Tieres sind die Aufnahmen außerdem nicht exakt in Raumebenen und Zeit angeordnet, um immer eine ausreichend Artefakt-arme 3-dimensionale Rekonstruktion zu gewährleisten. Darüber hinaus ist die Patch-Clamp Methode technisch höchst anspruchsvoll und erfordert typischerweise langjährige Erfahrung.

Zukünftige Forschung sollte zusammenfassend strukturelle Analysen idealerweise mit elektrophysiologischen und Verhaltensexperimenten verknüpfen, um somit ein ganzheitlicheres Verständnis der AD Pathologie zu gewinnen.

Um therapeutische Ansatzpunkte abzuleiten, fehlen folglich noch fortführende Experimente, wobei diese technisch höchst anspruchsvoll sind.

Diese könnten jedoch Aufschluss darüber geben, ob eine Rezeptor Defizienz beim Menschen die Progredienz der AD verlangsamen oder aufhalten könnte.

5. Zusammenfassung

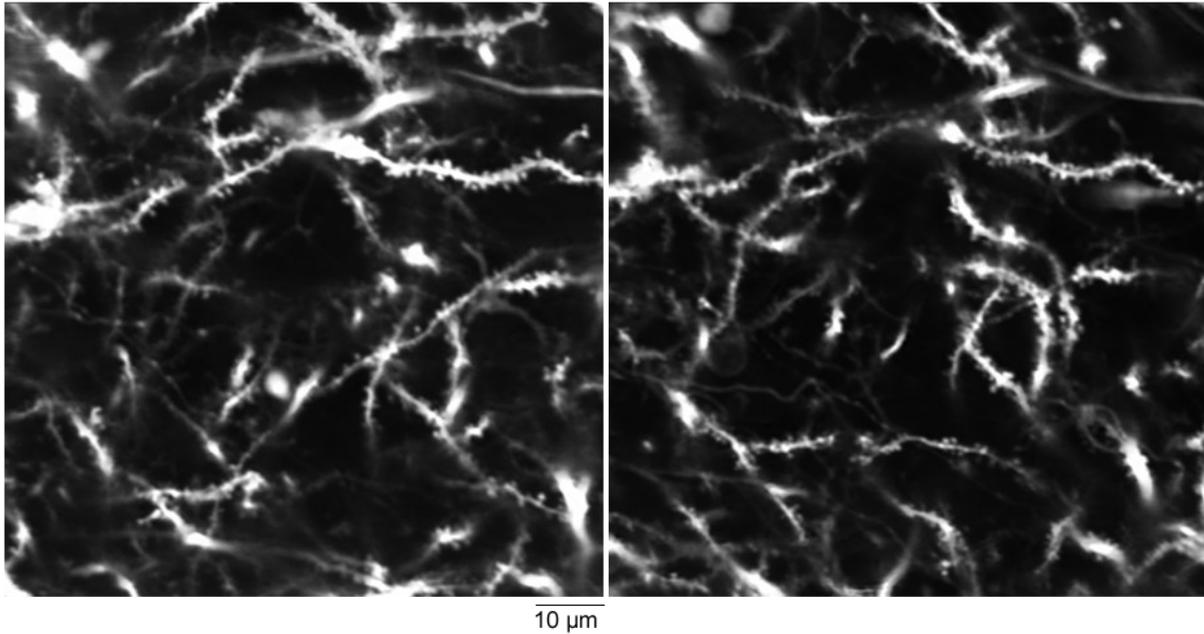
Zusammenfassend war das Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung des CX3CR1-Rezeptors für die AD-Pathologie zu untersuchen. Dabei wurden kraniale Fensterungen in Mäusen vorgenommen, wobei der Fokus auf dem AD-Modell $APP_{swE}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ lag.

Mittels transgener Fluoreszenz-Markierung der neuronalen und mikroglialen Strukturen konnten in *in-vivo* Aufnahmen an mehreren Zeitpunkten Spines, Dendriten und Mikroglia beobachtet werden. Dabei konnten die Spinedichte, der Spineverlust, der Dendritenverlust und die mikrogliale Berührungsrate in Abhängigkeit vom CX3CR1-Rezeptor-Genotyp verglichen werden. Außerdem konnten mittels intraperitonealer Methoxy-X04 Injektion A β -Plaques markiert und die Spinedichten, die Spineverluste, die Dendritenverluste sowie die mikrogliale Berührungsrate in Abhängigkeit zur Entfernung zum A β -Plaque zu verschiedenen Zeitpunkten und im Vergleich der CX3CR1-Rezeptor-Genotypen analysiert werden.

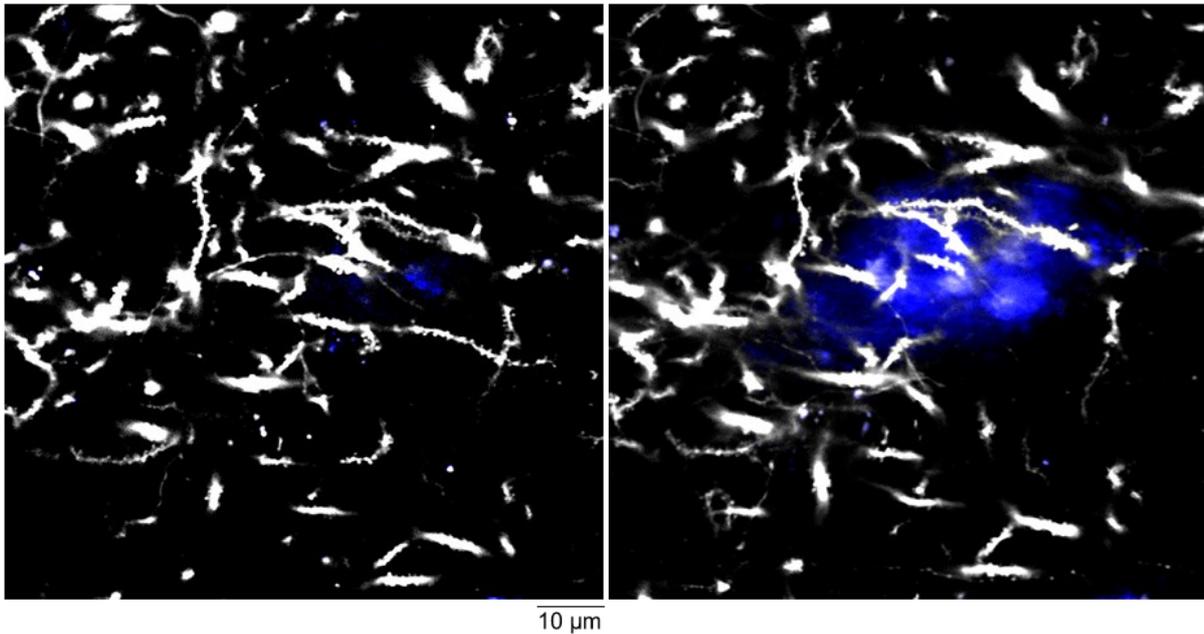
Es zeigte sich, dass eine CX3CR1-Defizienz mit zunehmendem Alter der Mäuse in A β -Plaque Nähe mit einem signifikant verringerten Spineverlust korreliert. Die CX3CR1-Defizienz korrelierte auch mit einem verringerten Dendritenverlust in A β -Plaque Nähe. Außerdem ergab sich eine signifikant verringerte mikrogliale Berührungsrate in A β -Plaque Nähe bei CX3CR1-Defizienz. Bei einer Entfernung von $> 25 \mu\text{m}$ zum A β -Plaque zeigten sich zu keinem Messzeitpunkt Unterschiede bei der Spinedichte, dem Spineverlust, dem Dendritenverlust und der mikroglialen Berührungsrate.

6. Anhang

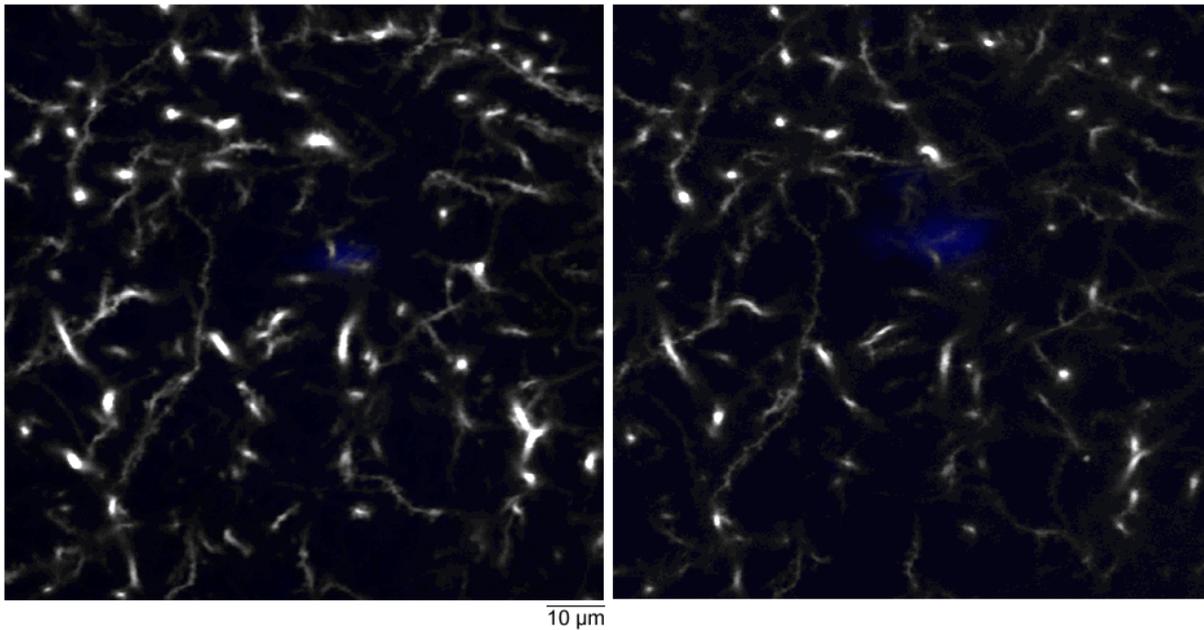
Die Anhänge zeigen 1 μm optische Schnittebenen im Stratum radiatum des Hippokampus der Mäuse. Die Aufnahmen gelangen mit 2-Photonen-*in vivo*-Mikroskopie.



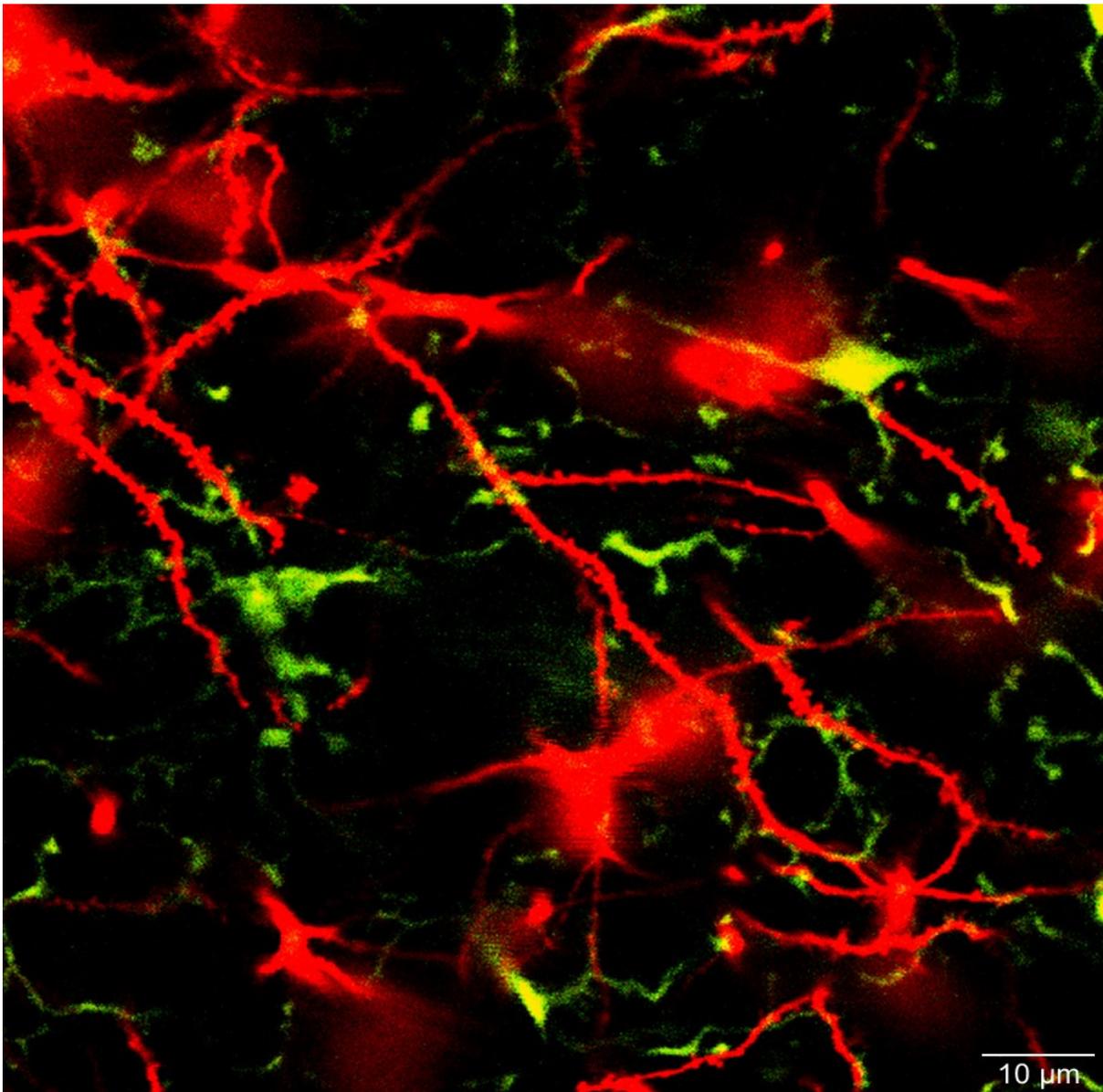
Anhang 1: Übersichtsaufnahme $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$
Dendriten (weiß). $CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ Maus bei 4 (links) und 7 Monaten (rechts).



Anhang 2: Übersichtsaufnahme $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/wt}::Thy1^{YFP/wt}$ Mäus bei 4 (links) und 7 Monaten (rechts). Dendriten im 25 μm Radius zum A β -Plaques sind bei 7 Monaten teilweise verschwunden.



Anhang 3: Übersichtsaufnahme $APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}$ Mäus bei 4 (links) und 7 Monaten (rechts).



Anhang 4: Übersichtsaufnahme *APP_{swe}/PS1::CX3CR1^{GFP/GFP}::Thy1^{YFP/wt}*
Dendriten (rot), Mikroglia Zellkörper (grün-gelb), Mikroglia Filopodien (grün),
Berührungspunkte (gelb). Die Übersicht wurde im Alter von sieben Monaten erstellt und
ist Teil einer Zeitserie (7 Bilderstapel im Abstand von je 5 Minuten).

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Amyloidogene APP Prozessierung und Entstehung von A β	10
Abbildung 2: Physiologische und pathologische Funktionen von Tau	12
Abbildung 3: Zusammensetzung und Funktion des γ -Sekretase Komplexes	13
Abbildung 4: Morphologische Einteilung von Spines nach Kaiserman-Abramof	14
Abbildung 5: Operativer Ablauf der Implantation eines kranialen Fensters	21
Abbildung 6: Fluoreszenz-Schema in Anlehnung an das Jablonksi-Diagramm	24
Abbildung 7: Illustration der wiederholten Repositionierung von Bildausschnitten	26
Abbildung 8: Schema der CA1-Region und des Bilderstapels	27
Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf der Serien-Aufnahmen	29
Abbildung 10: Spinedichten in AD-ähnlichen Mauslinien und Kontrollgruppen	32
Abbildung 11: Spinedichten im AD-ähnlichen Mausmodell am A β Plaque	33
Abbildung 12: Spinedichten in 3xTgAD Mäusen im Alter von 20 Monaten	34
Abbildung 13: Spine Verluste im AD-ähnlichen Mausmodell an A β -Plaques	35
Abbildung 14: Dendritenverlust im AD-ähnlichen Mausmodell in A β -Plaque Nähe	38
Abbildung 15: Mikroglia Berührungsrate im AD-ähnlichen Mausmodell	40

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Medikamente und Utensilien	22
Tab. 2 Verwendete Filtersets zur Darstellung der Fluoreszenzsignale	25
Tab. 3 Abkürzungen der Genotypen in Abbildungen	28

9. Literaturverzeichnis

Alavi Naini, S. M. and Soussi-Yanicostas, N. (2015) 'Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies?', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2015/151979.

Alzheimer, A. (1907) 'Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.', *Allg Zeitschr f Psychiatrie u Psych-Gerichtl Med*, 64(64), pp. 146–8. doi: 10.1002/ca.980080612.

Andreas Hufschmidt, Carl Hermann Lücking, Sebastian Rauer, F. X. G. (2017) *Neurologie compact*. 7. Auflage. Thieme Verlag.

Annis, C. M., O'Dowd, D. K. and Robertson, R. T. (1994) 'Activity-dependent regulation of dendritic spine density on cortical pyramidal neurons in organotypic slice cultures', *J Neurobiol*, 25(12), pp. 1483–1493. doi: 10.1002/neu.480251202.

Arbel-Ornath, M. *et al.* (2017) 'Soluble oligomeric amyloid- β induces calcium dyshomeostasis that precedes synapse loss in the living mouse brain', *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 27. doi: 10.1186/s13024-017-0169-9.

Asensio, V. C. and Campbell, I. L. (1999) 'Chemokines in the CNS: Plurifunctional mediators in diverse states', *Trends in Neurosciences*, pp. 504–512. doi: 10.1016/S0166-2236(99)01453-8.

Baggiolini, M., Dewald, B. and Moser, B. (1997) 'Human Chemokines - an Update', *Annual Review of Immunology*, 15, pp. 675–705. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.675.

Baranello, R. J. *et al.* (2015) 'Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer's Disease', *Current Alzheimer Research*, 12, pp. 32–46. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1567205012666141218140953>.

Beker, S. *et al.* (2012) 'Interaction between amyloid- β pathology and cortical functional columnar organization', *Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2426-12.2012.

Beker, S. *et al.* (2016) 'Amyloid- β disrupts ongoing spontaneous activity in sensory cortex', *Brain Structure and Function*. doi: 10.1007/s00429-014-0963-x.

Benninger, R. K. P. and Piston, D. W. (2013) 'Two-photon excitation microscopy for the study of living cells and tissues.', *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 4, p. Unit 4.11.1-24. doi: 10.1002/0471143030.cb0411s59.

Bentahir, M. *et al.* (2006) 'Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase

- activity by different mechanisms.', *Journal of neurochemistry*, 96(3), pp. 732–742. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03578.x.
- Bergmans, B. A. and De Strooper, B. (2010) 'γ-secretases: from cell biology to therapeutic strategies', *The Lancet Neurology*. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70332-1.
- Billingsley, M. L. and Kincaid, R. L. (1997) 'Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration.', *The Biochemical journal*, 323 (Pt 3(3), pp. 577–91. doi: 10.1042/bj3230577.
- Brion, J. P. (1998) 'Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease', *European Neurology*, pp. 130–140. doi: 10.1159/000007969.
- Cardona, A. E. *et al.* (2006) 'Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor.', *Nature neuroscience*, 9(7), pp. 917–924. doi: 10.1038/nn1715.
- Carrasquillo, M. M. *et al.* (2011) 'Replication of EPHA1 and CD33 associations with late-onset Alzheimer's disease: A multi-centre case-control study', *Molecular Neurodegeneration*. doi: 10.1186/1750-1326-6-54.
- Chan, W. Y., Kohsaka, S. and Rezaie, P. (2007) 'The origin and cell lineage of microglia- New concepts', *Brain Research Reviews*, pp. 344–354. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.11.002.
- Cohen, R. M. *et al.* (2013) 'A Transgenic Alzheimer Rat with Plaques, Tau Pathology, Behavioral Impairment, Oligomeric A_β, and Frank Neuronal Loss', *Journal of Neuroscience*, 33(15), pp. 6245–6256. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3672-12.2013.
- Colton, C. a and Wilcock, D. M. (2010) 'Assessing activation states in microglia.', *CNS & neurological disorders drug targets*, 9(2), pp. 174–91. doi: 10.2174/187152710791012053.
- Crotti, A. and Ransohoff, R. M. (2016) 'Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling', *Immunity*. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.013.
- Dailey, M. E. and Smith, S. J. (1996) 'The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(9), pp. 2983–2994.
- Davalos, D. *et al.* (2005) 'ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo.', *Nature neuroscience*, 8(6), pp. 752–8. doi: 10.1038/nn1472.

- Denk, W., Strickler, J. H. and Webb, W. W. (1990) 'Two-photon laser scanning fluorescence microscopy.', *Science (New York, N.Y.)*, 248(4951), pp. 73–6. doi: 10.1126/science.2321027.
- Diaspro, A. *et al.* (2006) 'Multi-photon excitation microscopy', *BioMedical Engineering Online*. doi: 10.1186/1475-925X-5-36.
- Dickstein, D. L. *et al.* (2013) 'Dendritic spine changes associated with normal aging', *Neuroscience*, pp. 21–32. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.077.
- Dixit, R. *et al.* (2008) 'Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau', *Science*, 319(February), pp. 8–11. doi: doi:10.1126/science.1152993.
- Duan, H. *et al.* (2003) 'Age-related dendritic and spine changes in corticocortically projecting neurons in macaque monkeys', *Cerebral Cortex*, 13(9), pp. 950–961. doi: 10.1093/cercor/13.9.950.
- Duthey, B. (2013) 'Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias, Update on 2004', *World Health Organization*, (February), pp. 1–77.
- Eggen, B. J. L. *et al.* (2013) 'Microglial phenotype and adaptation', *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. doi: 10.1007/s11481-013-9490-4.
- Elbaum-garfinkle, S. *et al.* (2014) 'Tau mutants bind tubulin heterodimers with enhanced affinity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), pp. 6311–6. doi: 10.1073/pnas.1315983111.
- Evin, G. (2008) 'γ-secretase modulators: Hopes and setbacks for the future of Alzheimer's treatment', *Expert Review of Neurotherapeutics*. doi: 10.1586/14737175.8.11.1611.
- Feng, G. *et al.* (2000) 'Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP', *Neuron*. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00084-2.
- Fernandez, E. J. and Lolis, E. (2002) 'S Tructure , F Unction , and I Nhibition of C Hemokines', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 42, pp. 469–499. doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.381.
- Fiala, J. C., Spacek, J. and Harris, K. M. (2002) 'Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders?', *Brain Research Reviews*, pp. 29–54. doi: 10.1016/S0165-0173(02)00158-3.
- Fuhrmann, M. *et al.* (2010) 'Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease', *Nature Neuroscience*, 13(4), pp. 411–413. doi: 10.1038/nn.2511.

- Gandy, S. and Heppner, F. L. (2013) 'Microglia as Dynamic and Essential Components of the Amyloid Hypothesis', *Neuron*, pp. 575–577. doi: 10.1016/j.neuron.2013.05.007.
- Godyn, J. *et al.* (2016) 'Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials', *Pharmacological Reports*, 68(1), pp. 127–138. doi: 10.1016/j.pharep.2015.07.006.
- Göppert-Mayer, M. (1931) 'Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen', *Annalen der Physik*. doi: 10.1002/andp.19314010303.
- Graeber, M. B. and Streit, W. J. (2010) 'Microglia: Biology and pathology', *Acta Neuropathologica*, pp. 89–105. doi: 10.1007/s00401-009-0622-0.
- Gray, E. and Guillery, R. (1963) 'A note on the dendritic spine apparatus', *Journal of anatomy*, pp. 389–392.
- Hanisch, U.-K. K. and Kettenmann, H. (2007) 'Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain', *Nature Neuroscience*, 10(11), pp. 1387–1394. doi: 10.1038/nn1997.
- Hickman, S. E., Allison, E. K. and El Khoury, J. (2008) 'Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(33), pp. 8354–60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.
- Huang, W. C. *et al.* (2009) 'Enlargement of A β aggregates through chemokine-dependent microglial clustering', *Neuroscience Research*, 63(4), pp. 280–287. doi: 10.1016/j.neures.2009.01.001.
- Jacobs, B., Driscoll, L. and Schall, M. (1997) 'Life-span dendritic and spine changes in areas 10 and 18 of human cortex: A quantitative golgi study', *Journal of Comparative Neurology*, 386(4), pp. 661–680. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19971006)386:4<661::AID-CNE11>3.0.CO;2-N.
- Jandus, C., Simon, H. U. and Von Gunten, S. (2011) 'Targeting Siglecs-A novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy', *Biochemical Pharmacology*. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.018.
- Jankowsky, J. L. *et al.* (2004) 'Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue ??-amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific ?? secretase', *Human Molecular Genetics*, pp. 159–170. doi: 10.1093/hmg/ddh019.
- Jellinger, K. A. (2002) 'Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: An update', *Journal of Neural Transmission*, pp. 813–836. doi: 10.1007/s007020200068.

- Jontes, J. D., Buchanan, J. and Smith, S. J. (2000) 'Growth cone and dendrite dynamics in zebrafish embryos: early events in synaptogenesis imaged in vivo.', *Nature neuroscience*, 3(3), pp. 231–7. doi: 10.1038/72936.
- Jung, S. *et al.* (2000) 'Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.20.11.4106-4114.2000.
- Kaduszkiewicz, H. *et al.* (2005) 'Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials.', *BMJ (Clinical research ed.)*, 331(7512), pp. 321–327. doi: 10.1136/bmj.331.7512.321.
- Kato K1, Clifford DB, Z. C. (1993) 'Long-term potentiation during whole-cell recording in rat hippocampal slices.', *Neuroscience.*, 1, pp. 39–47.
- Kettenmann, H. *et al.* (2011) 'Physiology of microglia.', *Physiological reviews*, 91(2), pp. 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
- Kim, K. *et al.* (2011) 'In vivo structure / function and expression analysis of the CX 3 C chemokine fractalkine', *Blood*, 118(22), pp. 156–167. doi: 10.1182/blood-2011-04-348946.This.
- Kristen M. Harris, Kater, S. B. (1994) 'Dendritic Spines: Cellular Specializations impairing both Stability and Flexibility to Synaptic Function', *Annu. Rev. Neurosci.*, 17(341), p. 71. doi: 10.1146/annurev.ne.17.030194.002013.
- Kuchibhotla, K. V. *et al.* (2008) 'A β Plaques Lead to Aberrant Regulation of Calcium Homeostasis In Vivo Resulting in Structural and Functional Disruption of Neuronal Networks', *Neuron*, 59(2), pp. 214–225. doi: 10.1016/j.neuron.2008.06.008.
- Lanctôt, K. L. *et al.* (2003) 'Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis.', *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 169(6), pp. 557–64. doi: za2963e q8za9 q8zb8 q8zc9 q8zd4 q8zeb q8zf5 q8zg5.
- Lee, S. *et al.* (2010) 'CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models.', *The American journal of pathology*, 177(5), pp. 2549–62. doi: 10.2353/ajpath.2010.100265.
- Lendvai, B. *et al.* (2000) 'Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo.', *Nature*, 404(6780), pp. 876–881. doi: 10.1038/35009107.

- Liang, K. J. *et al.* (2009) 'Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(9), pp. 4444–4451. doi: 10.1167/iovs.08-3357.
- Liu, C. *et al.* (2014) 'Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors', *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, pp. 8342–8355. doi: D - nlm: pmc4314046 oto - notnlm.
- Maina, M. B., Al-Hilaly, Y. K. and Serpell, L. C. (2016) 'Nuclear tau and its potential role in alzheimer's disease', *Biomolecules*, pp. 2–20. doi: 10.3390/biom6010009.
- Mattsson, N. *et al.* (2011) 'The Alzheimer's Association external quality control program for cerebrospinal fluid biomarkers', *Alzheimer's and Dementia*, 7(4). doi: 10.1016/j.jalz.2011.05.2243.
- Mattsson, N. *et al.* (2012) 'Age and diagnostic performance of Alzheimer disease CSF biomarkers', *Neurology*, 78(7), pp. 468–476. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182477eed.
- Mayeux, R. and Stern, Y. (2012) 'Epidemiology of Alzheimer disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8). doi: 10.1101/cshperspect.a006239.
- Mucke, L. and Selkoe, D. J. (2012) 'Neurotoxicity of amyloid β -protein: Synaptic and network dysfunction', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7). doi: 10.1101/cshperspect.a006338.
- Napoli, I., Kierdorf, K. and Neumann, H. (2009) 'Microglial precursors derived from mouse embryonic stem cells', *GLIA*. doi: 10.1002/glia.20878.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. and Svoboda, K. (2002) 'STRUCTURE AND FUNCTION OF DENDRITIC SPINES', *Annual Review of Physiology*, 64(1), pp. 313–353. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. (2005) 'Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo', *Neuroforum*, 11(3), pp. 95–96. doi: 10.1126/science.1110647.
- Okun, E. *et al.* (2009) 'Toll-like receptors in neurodegeneration [Review]', *Brain Research Reviews*, 59(2), pp. 278–292. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.09.001.
- Ono, K., Condrón, M. M. and Teplow, D. B. (2009) 'Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), pp. 14745–50. doi: 10.1073/pnas.0905127106.
- Peters, a, Sethares, C. and Moss, M. B. (1998) 'The effects of aging on layer 1 in area

- 46 of prefrontal cortex in the rhesus monkey.', *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 8(8), pp. 671–684. doi: 10.1093/cercor/8.8.671.
- Peters, A., Proskauer, C. C. and Kaiserman-Abramof, I. R. (1968) 'The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The axon hillock and initial segment.', *Journal of Cell Biology*, 39(3), pp. 604–619. doi: 10.1083/jcb.39.3.604.
- Peters, A., Sethares, C. and Luebke, J. I. (2008) 'Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex', *Neuroscience*, 152(4), pp. 970–981. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.014.
- Porrero, C. *et al.* (2010) 'Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice', *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.061.
- Ramón y Cajal, S. (1898) 'Estructura del kiasma optico y teoria general de los entrecruzamientos de las vias nerviosas [german 1899, english 2004].', *Revista Trimestral Micrográfica*, 3, pp. 15–65.
- Rosenmann, H. *et al.* (2012) 'Editorial Tau Protein: Function and Pathology', *International Journal of Alzheimer's Disease Article ID*, 707482(2). doi: 10.1155/2012/707482.
- dos Santos, L. R. *et al.* (2017) 'Validating GWAS Variants from Microglial Genes Implicated in Alzheimer's Disease', *Journal of Molecular Neuroscience*. doi: 10.1007/s12031-017-0928-7.
- Selkoe, D. J. and Wolfe, M. S. (2007) 'Presenilin: Running with Scissors in the Membrane', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.012.
- Shankar, G. M. and Walsh, D. M. (2009) 'Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Abeta.', *Molecular neurodegeneration*, 4(1), p. 48. doi: 10.1186/1750-1326-4-48.
- Shea, Y. F. *et al.* (2016) 'A systematic review of familial Alzheimer's disease: Differences in presentation of clinical features among three mutated genes and potential ethnic differences', *Journal of the Formosan Medical Association*, pp. 67–75. doi: 10.1016/j.jfma.2015.08.004.
- Strang, K. H., Golde, T. E. and Giasson, B. I. (2019) 'MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration', *Laboratory Investigation*. doi: 10.1038/s41374-019-0197-x.
- Streit, W. J. *et al.* (2005) 'Role of microglia in the central nervous system's immune response.', *Neurological research*, 27(7), pp. 685–91. doi: 10.1179/016164105X49463.

- Walsh, D. M. *et al.* (1997) 'Amyloid β -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate', *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.272.35.22364.
- Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. (2007) 'A β oligomers - A decade of discovery', *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x.
- Walter, S. *et al.* (2007) 'Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease.', *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 20(6), pp. 947–56. doi: 10.1159/000110455.
- Wang, H. *et al.* (2012) 'Consequences of inhibiting amyloid precursor protein processing enzymes on synaptic function and plasticity', *Neural Plasticity*. doi: 10.1155/2012/272374.
- Westrum, L. E. *et al.* (1980) 'Microtubules, dendritic spines and spine apparatuses.', *Cell and tissue research*, 208(2), pp. 171–181. doi: 10.1007/BF00234868.
- Winblad, B. *et al.* (2007) 'A six-month double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer's disease--rivastigmine patch versus capsule.', *International journal of geriatric psychiatry*, 22(5), pp. 456–467. doi: 10.1002/gps.1788.
- Wolfe, M. S. (2006) 'The γ -secretase complex: Membrane-embedded proteolytic ensemble', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi060799c.
- Yuste, R., Majewska, A and Holthoff, K. (2000) 'From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines.', *Nature neuroscience*, 3(7), pp. 653–9. doi: 10.1038/76609.
- Zheng, H. and Koo, E. H. (2006) 'The amyloid precursor protein: beyond amyloid.', *Molecular neurodegeneration*, 1, p. 5. doi: 10.1186/1750-1326-1-5.
- Ziegler-Graham, K. *et al.* (2008) 'Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates.', *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 4(5), pp. 316–323. doi: 10.1016/j.jalz.2008.05.2479.
- Ziv, N. E. and Smith, S. J. (1996) 'Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation', *Neuron*, 17(1), pp. 91–102. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80283-4.

10. Danksagung

Hiermit möchte ich noch den Personen danken, die mich unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich bei Ligang Gu, der für die 3xTgAD Mäuse die kranialen Fensterungen durchgeführt hat. Julia Steffen war für die Genotypisierung und die Anlieferung der Mäuse zuständig – sie half mir auch beim Umgang mit Programmen wie FIJI und Mausoleum. Julia Steffen und Manuel Mittag möchte ich auch dafür danken, dass sie mir den abendlichen Remote-Zugang zu meinem DZNE-Server ermöglicht haben, als ich tagsüber hauptberuflich durch meine Tätigkeit als Ärztin verhindert war.

Außerdem möchte ich natürlich auch allen danken, die mit mir konstruktive Diskussionen geführt und mir hilfreiche Ratschläge gegeben haben, insbesondere Martin Fuhrmann.

Meinem Ehemann und meiner Familie gilt besonderer Dank für all die Unterstützung und den Mut, den sie mir zugesprochen haben.