

EVALUIERUNG FLUOROCHROMER SONDEN FÜR EIN
NICHT-INVASIVES FRÜHERKENNUNGSVERFAHREN
VON MORBUS ALZHEIMER

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Troph. Jana Hölzer
geboren am 29.10.1984 in Sömmerda

November 2013

Gutachter

1. Prof. Dr. Ingrid Hilger, Jena
2. Prof. Dr. Dagmar Fischer, Jena
3. Prof. Dr. Frauke Alves, Göttingen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.09.2014

Die Fragen sind es, aus denen das, was bleibt, entsteht.

Erich Kästner

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

A	Österreich
Abb.	Abbildung
Aβ	Amyloid- β
Aβ1-40	Amyloid- β -Peptid mit 40 Aminosäuren
Aβ1-42	Amyloid- β -Peptid mit 42 Aminosäuren
AD	englisch: Alzheimer's Disease (Alzheimer'sche Erkrankung)
ATF4	Aktivierender Transkriptionsfaktor 4
ATF6B	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6 Beta
ATG12	englisch: autophagy related homolog 12
ATG5	englisch: autophagy related homolog 5
ATG7	englisch: autophagy related homolog 7
ATM	englisch: ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	englisch: ataxia telangiectasia und Rad3 related
BBC3	englisch: BCL2 binding component 3
BECN1	Beclin 1
BID	englisch: BH3 interacting domain death agonist
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
c	Stoffmengenkonzentration (mol/L)
CALR	Calreticulin
CASP1	Caspase 1
CCL2	C-C-Chemokin -Ligand 2
CD40LG	CD40-Ligand
CDKN1A	englisch: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A)
cDNA	englisch: complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CERAD	englisch: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CH	Schweiz
CHEK1	Checkpoint-Kinase 1
CHEK2	Checkpoint-Kinase 2
CRP	C-reaktives Protein
ct	englisch: cycle of threshold (Schwellenwert-Zyklus in der qRT-PCR)
CT	Computertomographie
D	Deutschland
DCF	2',-7'-dichlorodihydrofluorescein
DDB2	englisch: damage-specific DNA binding protein 2
DDIT3	englisch: DNA-damage-inducible transcript 3
DMEM	englisch: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	englisch: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNAJC3	englisch: DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
DTT	Dithiothreitol

EC₅₀	englisch: effective dose 50 % (mittlere effektive Konzentration)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Em.	Emission (Emissionswellenlänge)
Exc.	Exzitation (Anregungswellenlänge)
FAS	TNF-Rezeptor Fas
FD	FITC-Dextran
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FTH	Ferritin
FKS	Fetales Kälberserum
FSB	(E,E)-1-fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene
g	Erdbeschleunigung
GADD45A	englisch: growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GADD45G	englisch: growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
GCLC	englisch: glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit (Glutamat-Cystein-Ligase, katalytische Untereinheit)
GCLM	englisch: glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (Glutamat-Cystein-Ligase, regulatorische Untereinheit)
GRB2	englisch: growth factor receptor-bound protein 2
GSR	Glutathion-Reduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
GSTP1	Glutathion S-Transferase Pi 1
GSTT2	Glutathion-S-Transferase Theta 2
GSTT2A	Glutathion-S-Transferase Theta 2A
HHpC	englisch: human hepatocytes (humane Hepatozyten)
HBSS	englisch: Hank's balanced salt solution (gepufferte Salzlösung)
hEGF	englisch: human epidermal growth factor (Humaner epidermaler Wachstumsfaktor)
HMEC-1	englisch: human microvascular endothelial cell line (humane mikrovaskuläre Endothelzellen)
HMOX1	Hämoxygenase 1
HNEpC	englisch: human nasal epithelial cells (humane Nasenepithelzellen)
hPC-PL	englisch: human pericytes from placenta (humane Perizyten der Plazenta)
HREpC	englisch: human renal epithelial cells (humane Nierenepithelzellen)
HSP90AA1	Hitzeschockprotein 90kDa Alpha A1
HSP90B1	Hitzeschockprotein 90kDa Beta 1
HSPA4	Hitzeschockprotein 4
HSPA5	Hitzeschockprotein 5
HUS1	englisch: HUS1 checkpoint homolog
HUVEC	englisch: human umbilical vein endothelial cells (Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene)
ICG	Indocyaningrün
IFNG	Interferon Gamma
IgG	Immunglobulin G
i.n.	intranasal
IL-1A	Interleukin 1 Alpha
IL-1B	Interleukin 1 Beta

IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
INL	englisch: inner nuclear layer (innere nukleäre Schicht)
i.p.	intraperitoneal
IPL	englisch: inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht)
IS	englisch: inner segments (innere Segmente der Photorezeptoren)
i.v.	intravenös
Keap1	englisch: Kelch like-ECH-associated protein 1
Kd	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MCL1	englisch: myeloid cell leukemia 1
MeX04	Methoxy-X04
mRNA	englisch: messenger ribonucleic acid (Boten-RNA)
MRE11A	englisch: MRE11 meiotic recombination 11 homolog A
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4sulfophenyl)-2H-Tetrazolium
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NBN	Nibrin
NFT	englisch: neurofibrillary tangle (Neurofibrilläre Bündel)
NHDF	englisch: normal human dermal fibroblasts (humane Hautfibroblasten)
NIR	Nahinfrarot
NMRI	englisch: The National Medical Research Institute
NQO1	englisch: NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NADH-Chinon-Oxidoreduktase-1)
Nrf2	englisch: Nuclear factor erythroid related factor 2
ONL	englisch: outer nuclear layer (äußere nukleäre Schicht)
OPL	englisch: outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht)
OS	englisch: outer segments (äußere Segmente der Photorezeptoren)
p	englisch: probability (Wahrscheinlichkeitswert)
p.a.	englisch: post application (nach der Applikation)
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	englisch: phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	englisch: polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PET	Positronenemissionstomographie
PHF	englisch: paired helical filament
p.i.	englisch: post injection (nach der Injektion)
PIB	Pittsburgh compound B
PRDX1	Peroxiredoxin 1
PVR	Poliovirus-Rezeptor
qRT-PCR	quantitative PCR (Real-Time-PCR)
RAD17	RAD17-Homolog
RAD51	RAD51-Homolog

RAD9A	RAD9-Homolog A
RIPK1	englisch: receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
ROS	englisch: reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RNA	englisch: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNFL	englisch: retinal nerve fibre layer (retinale Nervenfaserschicht)
ROI	englisch: region of interest (Region von Interesse)
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
S	Schweden
SQSTM1	Sequestosom 1
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TEER	englisch: transendothelial electric resistance (Transendothelialer elektrischer Widerstand)
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF1A	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1A
TNFRSF10A	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 10A
TNFRSF10B	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 10B
TP53	Tumorprotein p53
TPSA	englisch: topological polar surface area (topologische polare Oberfläche)
TXN	Thioredoxin
TXNRD1	Thioredoxinreduktase 1
U	englisch: enzyme unit (Einheit der Enzymaktivität)
UK	englisch: United Kingdom (Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland)
ULK1	Unc-51-like-Kinase 1
USA	englisch: United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
VIS	Visueller Wellenlängenbereich
vgl.	vergleiche
Vgl.	Vergleich
v/v	englisch: volume per volume (Volumenprozent)
w/v	englisch: weight per volume (Gewichtsprozent)
XPC	englisch: Xeroderma pigmentosum, complementation group C
z.B.	zum Beispiel

Verwendete Einheiten

°C	Grad Celsius
Da	Dalton
fM	femtomolar
h	englisch: hour/s (Stunde/n)
kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
J	Joule
L	Liter

mg	Milligramm
mL	Milliliter
M	Molar (mol/L)
min	Minuten
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
pm	pikomolar
rpm	englisch: rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde/n

Verwendete Anglizismen

Cutoff	Trennungsgrenze
Fold Change	Faktor der Genexpressionsveränderung im Vergleich zum Grundniveau
On target	an die Zielstruktur gebunden
Off target	ohne Bindung bzw. Vorhandensein der Zielstruktur
Target	Zielstruktur
Tracer	Indikatorsubstanz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG.....	3
2.1 <i>Morbus Alzheimer</i> und die klinische Alzheimer-Diagnostik.....	3
2.2 Die Molekulare Bildgebung als vielversprechende Diagnosetechnik für <i>Morbus Alzheimer</i>	4
2.3 Liganden von Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündeln in der Molekularen Bildgebung.....	6
2.4 Molekulare Bildgebung von <i>Morbus Alzheimer</i> mit fluorochromen Liganden.....	7
2.5 Die Retina als vielversprechendes Zielgewebe für die Molekulare Bildgebung von <i>Morbus Alzheimer</i>	9
2.6 Neuartige Fluoreszenzsonden auf der Basis von Bisstilbenen und asymmetrischen Hemicyaninen	11
3 ZIELE DER ARBEIT	15
4 MATERIAL UND METHODEN	18
4.1 Material.....	18
4.1.1 Geräte	18
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
4.1.3 Biologisches Untersuchungsmaterial.....	21
4.1.3.1 Zelllinien	21
4.1.3.2 Tiere.....	21
4.1.3.3 Sonstiges	22
4.1.4 Fluorochrome.....	23
4.1.5 Weitere Chemikalien	24
4.1.6 Kits.....	26
4.1.7 Puffer und Lösungen	27
4.1.8 Software.....	28
4.2 Methoden.....	28
4.2.1 Spektroskopische Charakterisierung der Fluorochrome	28
4.2.2 Bindungsverhalten der Fluorochrome gegenüber Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen	29

4.2.2.1	Erfassung der Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome mit A β 1-40- und A β 1-42-Peptiden	29
4.2.2.2	Bestimmung der Affinität der Fluorochrome zu A β 1-40-Peptiden.....	30
4.2.2.3	Detektierbarkeit neuropathologischer Ablagerungen durch NIR-Fluorochrome in humanen Hirnschnitten	31
4.2.3	Biokompatibilitätsuntersuchungen der Fluorochrome an humanen Zellen.....	31
4.2.3.1	Zellkultur	31
4.2.3.2	Ermittlung des Einflusses der Fluorochrome auf die Dehydrogenaseaktivität humaner Zellen in An- und Abwesenheit von Lichtstrahlung.....	32
4.2.3.3	Bestimmung der intrazellulären Akkumulation der Fluorochrome mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	34
4.2.3.4	Erfassung des Einflusses der Fluorochrome auf die intrazelluläre ROS-Produktion	35
4.2.3.5	Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter Fluorochrome auf die Genexpression stressrelevanter Enzyme mittels Dual-Luciferase-Reportergenanalyse und qRT-PCR.....	36
4.2.4	Untersuchungen zur Abschätzung der Hirngängigkeit der fluorochromen Sonden.....	37
4.2.4.1	Ermittlung des Molekulargewichtes, des LogP-Wertes und des TPSA-Wertes	37
4.2.4.2	Einschätzung der Lipophilie der fluorochromen Sonden über die experimentelle Bestimmung des LogP-Wertes	38
4.2.4.3	Ermittlung des Potentials der Fluorochrome zur Permeation durch einen Zellmonolayer mithilfe eines <i>in vitro</i> -Blut-Hirn-Schranke-Modells.....	38
4.2.4.4	Erfassung der Anreicherung der Fluorochromfavoriten in Auge und Gehirn nach intravenöser und intranasaler Applikation über <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Fluoreszenzmessung	40
4.2.4.5	Histologischer Nachweis und Lokalisation der <i>in vivo</i> applizierten Fluorochrome in Augen- und Hirngewebe.....	43
4.2.5	Untersuchungen zur Verteilung und den Ausscheidungswegen der Fluorochrome.....	43
4.2.5.1	Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration	43
4.2.5.2	Ermittlung der Biodistribution nach intravenöser und intranasaler Applikation von selektierten Fluorochromfavoriten.....	44

4.2.5.3 Bestimmung der Bluthalbwertszeit selektierter Fluorochromvarianten über die semiquantitative Vermessung der Fluorochromfluoreszenz im Auge <i>in vivo</i>	44
4.2.6 Statistik.....	45
5 E R G E B N I S S E	46
5.1 Spektroskopische Charakterisierung der Fluorochrome.....	46
5.2 Bindungsverhalten der Fluorochrome gegenüber Amyloid- und Tau-Fibrillen	47
5.2.1 Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome mit A β 1-40- und A β 1-42-Peptiden ..	47
5.2.2 Affinität der Fluorochrome zu A β 1-40-Peptiden	49
5.2.3 Detektierbarkeit neuropathologischer Ablagerungen durch NIR-Fluorochrome an humanen Hirnschnitten.....	49
5.3 Biokompatibilität der Fluorochrome gegenüber humanen Zellen.....	51
5.3.1 Einfluss der Fluorochrome auf die Dehydrogenaseaktivität humaner Zellen	51
5.3.2 Intrazelluläre Akkumulation der Fluorochrome	58
5.3.3 Einfluss der Fluorochrome auf die intrazelluläre ROS-Produktion	58
5.3.4 Einfluss ausgewählter Fluorochrome auf die Genexpression stressrelevanter Enzyme.....	59
5.4 Hirngängigkeit der fluorochromen Sonden.....	63
5.4.1 Einschätzung der Hirngängigkeit der fluorochromen Sonden über die Bestimmung des LogP-Wertes in Kombination mit weiteren polaritäts- bestimmenden Parametern sowie dem Molekulargewicht und der Ladung.....	63
5.4.2 <i>In vitro</i> -Permeation der Fluorochrome durch einen Zellmonolayer.....	64
5.4.3 Anreicherung der Fluorochromfavoriten in Auge und Gehirn nach intravenöser und intranasaler Applikation	65
5.5 Verteilung und Ausscheidungswege der Fluorochrome	75
5.5.1 Plasmaproteinbindung der Fluorochrome	75
5.5.2 Biodistribution der Fluorochromfavoriten nach intravenöser und intranasaler Applikation	75
5.5.3 Bluthalbwertszeit ausgewählter NIR-Fluorochrome	77
6 D I S K U S S I O N	79
6.1 Selektion targetaffiner Fluorochrome für die fluoreszenzbildgebende Detektion neuropathologischer Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen	79

6.2 Eignung der Fluorochrome für eine humane Anwendung im Hinblick auf ihre Biokompatibilität.....	85
6.3 Potential der Fluorochrome für die <i>in vivo</i> -Bildgebung von <i>Morbus Alzheimer</i> über das Auge	93
7 SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	98
8 LITERATUR - UND QUELLENVERZEICHNIS.....	VI
9 ANHANG.....	XVI
9.1 Ehrenwörtliche Erklärung.....	XVI
9.2 Danksagung.....	XVII

1 ZUSAMMENFASSUNG

Alzheimer (AD) ist die am häufigsten auftretende Demenzerkrankung, deren Prävalenz sich in Anbetracht einer sich in der Gesellschaft immer stärker ausbreitenden Altersstruktur in Zukunft vervielfachen wird, sofern sich die therapeutischen Möglichkeiten nicht verbessern. Da ein frühzeitiges Eingreifen in das Krankheitsgeschehen für wirksame Therapieansätze zwingend notwendig ist, ist die Frühdiagnose von Alzheimer eine unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung und den Einsatz wirksamer Therapeutika. Die Visualisierung der durch den fortschreitenden Nervenzelluntergang bedingten Atrophien und verminderten Stoffwechselaktivitäten des Gehirns mittels bildgebender Verfahren wie CT, MRT und PET, die gemeinsam mit kognitiven Tests und Liquoruntersuchungen in der derzeitigen Klinikroutine als Diagnosetechniken für Alzheimer eingesetzt werden, ist aufgrund des sehr langen asymptomatischen präklinischen Stadiums von Alzheimer für eine Frühdiagnose nicht geeignet. Die Molekulare Bildgebung der für Alzheimer typischen neuropathologischen Veränderungen, Amyloid-Plaques (A β) und Neurofibrillärenbündel (Tau), die Jahre vor der Manifestation erster klinischer Symptome im Gehirn und der Retina von Alzheimerpatienten nachweisbar sind, stellt dagegen eine vielversprechende Option zur Frühdiagnose dar. Als Ziel dieser Arbeit wurden fluorochrome Bis(arylviny)pyrazine, Bis(arylviny)pyrimidine als VIS-Fluorochrome und asymmetrischen Hemicyanine als NIR-Fluorochrome im Hinblick auf ihre Eignung als Sonden für ein strahlungsfreies, nicht-invasives AD-Frühdiagnoseverfahren auf der Basis fluoreszenzoptischer Bildgebung der retinalen A β - und Tau-Ablagerungen evaluiert. Als besonders targetaffine Substanzen konnten Vertreter der Bis(arylviny)pyrimidine selektiert werden, da sie eine gute Interkalationsfähigkeit gegenüber fibrillären Strukturen und Affinität zu aggregierten A β -Peptiden zeigten. Aufgrund ROS-vermittelter Beeinträchtigungen auf den Metabolismus vitaler Zellen durch die pyrimidinbasierten Strukturen wurde das Hauptaugenmerk vor allem auf das Bis(arylviny)pyrazin BSc4352 und das asymmetrische Hemicyanin DY-730 gesetzt, welche ebenso eine vielversprechende Interkalationsfähigkeit für fibrilläre Strukturen und A β -Affinitäten aufwiesen und sich spektral besser von der Autofluoreszenz des Augenhintergrundes unterscheiden ließen, gleichzeitig aber eine deutlich bessere Tolerierbarkeit durch vitale Zellen des Gefäßendothels, des nasalen Epithels, der Entgiftungs-

und Ausscheidungsorgane Leber und Niere sowie die Zellen der Zielorgane des Gehirns und der Augen erfuhren. Die Fluorochrome zeigten nicht nur bessere *in vitro*-Biokompatibilitäten als der *post mortem*-AD-Färbestandard Methoxy-X04 und das unspezifische, aber klinisch zugelassene Indocyaningrün, sondern lassen aufgrund ausbleibender ROS-Schäden sowie der detektierten fluorochrominduzierten Expressionssteigerung von Genen antioxidativ wirkender Enzyme und entgiftender Enzyme des Phase-II-Metabolismus sowie der damit verbundenen Aktivierung zahlreicher Biotransformationsreaktionen und zügigen Elimination aus dem Körper eine vielversprechende Prognose hinsichtlich einer Minimierung möglicher Nebenwirkungen nach einer *in vivo*-Anwendung zu. Das Fluorochrom BSc4352 konnte nach i.v. Applikation im Tierversuch die Blut-Retina-Schranke überschreiten und in die für die neuropathologischen Ablagerungen relevanten retinalen Schichten vordringen. Maßgebend dafür war vor allem das Molekulargewicht sowie die günstigen mäßig-lipophilen Eigenschaften von BSc4352, durch die letztendlich auch unspezifische Bindungen im Umgebungsgewebe und die Bioverfügbarkeit limitierenden Plasmaproteinbindungen gering gehalten werden konnten. Aufgrund starker Plasmaproteinbindung konnte für DY-730 zwar keine Hirn- bzw. Retinagängigkeit nachgewiesen werden, jedoch zeigte dieses Fluorochrom aufgrund seiner Fähigkeit, über olfaktorische Nervenbahnen nach i.n. Applikation das zentrale Nervensystem zu erreichen, eine zur i.v.-Applikation alternative, ebenso nicht-invasive Applikationsart für die Bildgebung von Neuropathologien auf. Aufgrund des möglicherweise durch zu gering konzentrierte Applikationsdosen nicht erfolgten Nachweises von DY-730 in der Retina, schied auch dieses Fluorochrom vorerst für den Einsatz in der Retina-basierten humanen Alzheimerdiagnostik aus. Daher zeigte das Fluorochrom BSc4352 das vielversprechendste Potential, die A β - und Tau-Ablagerungen der humanen Retina durch ein mit konfokaler Bildgebung gekoppeltes Fundusimaging des Auges nicht-invasiv und vor allem lange vor dem Auftreten der ersten Demenzsymptome fluoreszenzoptisch zu detektieren und eröffnete damit die Basis für einen erfolgsversprechenden Ansatz eines Frühdiagnoseverfahrens der Alzheimererkrankung.

2 EINLEITUNG

2.1 *Morbus Alzheimer* und die klinische Alzheimer-Diagnostik

Bedingt durch den weltweiten demographischen Wandel und die zunehmend steigende Lebenserwartung wachsen altersassoziierte Erkrankungen wie *Morbus Alzheimer* zu einer zunehmenden Belastung für die Gesundheitssysteme heran. Von den weltweit 36 Millionen Demenzerkrankten fallen etwa 50-75 % der Fälle auf *Morbus Alzheimer* (Prince und Jackson 2009). Gekennzeichnet von anfänglichen Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und der kognitiven Fähigkeiten über Sprach- und Ausdrucksstörungen, den Verlust der Orientierungsfähigkeit, Depressionen sowie Verhaltensstörungen nimmt die Krankheit mit einem fortschreitenden Persönlichkeitsverlust und Verfall körperlicher Funktionen einen tödlichen Verlauf (Chu 2012). Bisher eingesetzte Therapieformen beschränken sich neben kognitiven Gedächtnisübungen auf Acetylcholinesterase-Hemmer wie bspw. Donepezil, Rivastigmin und Galantamin, die allerdings nur auf die Symptome und nicht auf die Ursache der Alzheimererkrankung abzielen (Birks 2006; Hansen et al. 2008). Ohne eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten von *Morbus Alzheimer* wird mit einer Erhöhung der weltweiten Patientenzahl auf ca. 66 Millionen Betroffene für das Jahr 2030, auf 115 Millionen für das Jahr 2050 gerechnet (Prince und Jackson 2009). Unablässig für die Entwicklung und Anwendung wirksamer Therapeutika ist eine eindeutige und vor allem frühzeitige Diagnose der Erkrankung. Die derzeit in der Klinik angewandten Diagnosemethoden stützen sich auf das Zusammenspiel von Aussagen Familienangehöriger der Betroffenen, kognitiven Tests, Laboruntersuchungen und bildgebenden Verfahren wie CT, MRT und PET und erlauben keine sichere Diagnose von *Morbus Alzheimer* zu Lebzeiten des Patienten (Chu 2012). Die Anwendung kognitiver Testverfahren wie bspw. des Mini Mental Status Tests führt zwar gemeinsam mit den Aussagen aus dem Umfeld der Patienten zur Feststellung einer Demenz, kann aber nur schwer innerhalb der verschiedenen Demenzformen spezifizieren (Folstein et al. 1975; Ballard et al. 2011). Zur Unterscheidung zwischen einigen Demenzformen kann zwar eine biochemische Laboruntersuchung zur Bestimmung reduzierter A β 1-42-Spiegel und erhöhter Tau-Spiegel im *Liquor cerebrospinalis* erfolgen (Fjell et al. 2010), jedoch ist zum aktuellen Zeitpunkt auch diese Methode zur alleinigen Alzheimerdiagnose noch nicht ausgereift und der mit der Probengewinnung verbundene invasive Eingriff als Nachteil der

Methode zu werten. Die Darstellung der durch den fortschreitenden Nervenzelluntergang verursachten Hirnatrophien der Alzheimererkrankung durch bildgebende Verfahren wie CT und MRT kann genauso wie die Ermittlung der verminderten Stoffwechselaktivität durch PET erst in relativ späten Alzheimerstadien erfolgen. Diese Methoden liefern zwar die Möglichkeit, andere organische Läsionen (z.B. Gehirnblutungen, Schlaganfall) als Ursache für eine Demenz auszuschließen, können aber aufgrund der erst in den relativ späten Alzheimerstadien sichtbar werdenden anatomischen Veränderungen des Gehirns im Bereich der Furchen, Hirnkammern und Hirnfalten nicht zu einer Frühdiagnose der Erkrankung beitragen (Johnson et al. 2012).

Bedingt durch die bereits beschriebenen Limitationen in der *in vivo*-Diagnose von *Morbus Alzheimer* kann daher derzeit eine gesicherte Alzheimer-Diagnose nur *post mortem* erfolgen, indem das Gehirn des verstorbenen Patienten histologisch untersucht wird (Braak et al. 2006).

2.2 Die Molekulare Bildgebung als vielversprechende Diagnosetechnik für *Morbus Alzheimer*

Um trotz der relativ langen Dauer des präklinischen, asymptomatischen Stadiums eine Frühdiagnose und damit die Erforschung früh angesetzter Therapieformen für die Alzheimererkrankung zu ermöglichen, rückt die Molekulare Bildgebung als vielversprechende Diagnoseoption in das Zentrum des aktuellen Interesses der Alzheimerforschung. Die Molekulare Bildgebung ermöglicht die *in vivo*-Detektion molekularer Veränderungen auf zellulärer Ebene, lange bevor klinische Symptome auftreten (Weissleder und Mahmood 2001). Im Zentrum der Molekularen Bildgebung von *Morbus Alzheimer* steht der Nachweis der neuropathologischen Amyloid-Plaques (Amyloid- β -Plaques bzw. A β -Plaques) und Neurofibrillären Bündel (Tau).

Amyloid-Plaques setzen sich aus 40 und 42 Aminosäuren langen A β -Peptiden (A β 1-40 und A β 1-42) zusammen, die auf dem verstärkt bei Alzheimer auftretenden amyloidogenen Weg aus der Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch die β - und γ -Sekretase im Extrazellularraum akkumulieren (Hardy und Selkoe 2002; Zhou et al. 2011). Die sich aus den Monomeren bildenden, löslichen A β -Oligomere lagern sich zusammen und bilden mit weiteren A β -Monomeren sogenannte A β -Protofibrillen. Dabei neigen die A β 1-42-Peptide besonders zur Aggregation. Die aggregierten Protofibrillen bilden schließlich große,

unlösliche Fibrillen, die sich durch eine β -Faltblattstruktur auszeichnen und das Grundgerüst der Amyloid-Plaques darstellen (Lomakin et al. 1996; Serrano-Pozo et al. 2011; Gilbert 2013). Neurofibrillenbündel setzen sich aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zusammen, die im physiologischen Zustand mikrotubuli-assoziiert zur Stabilität des Zytoskeletts beitragen. Die bei einer Alzheimererkrankung hervorgerufene abnorme Hyperphosphorylierung der Tau-Proteine bewirkt eine intrazelluläre Akkumulation des hyperphosphorylierten Taus, was diese letztendlich zur Aggregation zu unlöslichen Neurofibrillen veranlasst (Iqbal et al. 2005; Spires-Jones et al. 2009). Die Neurofibrillen bestehen dabei aus gepaarten helikalen Filamenten (PHF) und geraden Filamenten, wobei die PHF genauso wie die Amyloid-Fibrillen eine typische β -Faltblattstruktur besitzen (Berriman et al. 2003).

Während es sich bei den Amyloid-Plaques um extrazelluläre Ablagerungen im Nervengewebe handelt, sind Neurofibrilläre Bündel vorrangig innerhalb der Nervenzellen detektierbar, können aber durch die im Krankheitsverlauf fortschreitende Instabilität des Zytoskeletts und das daraus resultierende Absterben der Zelle auch als extraneuronale „Ghost Tangles“ auftreten (Serrano-Pozo et al. 2011). Sowohl A β - als auch Tau-Ablagerungen sind im *Cortex* des Gehirns lokalisiert, wobei sie sich in ihrer kortikalen Ausbreitung im Krankheitsverlauf unterscheiden. Die Ausbreitung der Amyloid-Plaques, die größtenteils im *Isocortex* zu finden sind, beginnt in den basalen Bereichen des Frontal-, Temporal- und Occipitallappens und erstreckt sich danach innerhalb des *Isocortex* und über den *Hippocampus*. Zusätzlich können Amyloid-Ablagerungen in den molekularen Schichten des *Cerebellums* und im subkortikalen Kern auftreten (Braak und Braak 1991). Während klinisch-pathologische Studien darauf hinweisen, dass die Menge und Größe der Amyloid-Plaques nicht mit dem Schweregrad und der Dauer der Alzheimerkrankung korreliert, ist für die kortikalen Ablagerungen hyperphosphorylierter Tau-Aggregate ein Zusammenhang zwischen der Menge und Verteilung der Neurofibrillären Bündel und dem Krankheitsstadium nachgewiesen wurden (Arriagada et al. 1992; Hyman et al. 1993). Die anfängliche Entstehung der Neurofibrillenbündel im Temporallappen und der entorhinalen Cortexregion sowie der Befall des *Hippocampus* wurden in präklinischen bis sehr milden Demenzstadien beobachtet. Die Ausbreitung der Tau-Ablagerungen in weiteren Teilen des limbischen Systems und im Bereich der *Amygdala*, des *Thalamus* und des *Claustrums* geht mit mittelschweren klinischen Symptomen von Alzheimer einher, während ein Auftreten der hyperphosphorylierten Tau-

Proteine im *Isocortex* und anschließend in Bereichen primärer Sinnes- und Motoneuronen mit einer schweren und sehr fortgeschrittenen Alzheimersymptomatik gleichzusetzen ist (Braak und Braak 1991; Arriagada et al. 1992; Giannakopoulos et al. 2003). Damit würde sich die Überwachung der Tau-Ablagerungen zwar besser für die Beobachtung eines Therapieverlaufs eignen als die kurz nach dem Einsetzen der ersten kognitiven Beeinträchtigungen der Alzheimerpatienten stagnierende Ausbreitung isokortikalen Amyloid-Plaques (Ingelsson et al. 2004; Serrano-Pozo et al. 2011). Diese Tatsache beeinträchtigt allerdings nicht die Eignung von Amyloid-Plaques, neben den Neurofibrillären Bündeln, für die Frühdiagnose des *Morbus Alzheimer*, denn beide neuropathologischen Ablagerungen treten Jahre vor dem Erscheinen der ersten Demenzsymptome auf (Bateman et al. 2012; Chu 2012).

2.3 Liganden von Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündeln in der Molekularen Bildgebung

Bedingt durch die kortikale Lokalisation der neuropathologischen Ablagerungen konzentrierte sich die molekulare Bildgebung von *Morbus Alzheimer* bisher vor allem auf die Entwicklung von Liganden für die Positronenemissionstomographie des Gehirns, wovon sich einige Sondenmoleküle bereits in der klinischen Erprobungsphase befinden. Dabei sei beispielsweise der Amyloid- β -Tracer *Pittsburgh compound B* (PiB) zu erwähnen, der eine gesteigerte Anreicherung im betroffenen *Cortex* von Alzheimerpatienten mit milder Symptomatik im Vergleich zu gesunden Probanden sowie eine Korrelation der *in vivo*-dargestellten A β -Ablagerungen mit *post mortem* ermittelten Daten zeigte (Klunk et al. 2004; Kempainen et al. 2007; Scheinin et al. 2009). Der ^{18}F -markierte A β -Tracer Florbetapir ist unter dem Markennamen AmyvidTM (Eli Lilly and Company) seit Januar 2011 für ein PET-Diagnoseverfahren bei Demenzverdacht in den USA bereits zugelassen und zeigte während der klinischen Erprobung eine gute Unterscheidung zwischen gesunden und an AD erkrankten Personen (Lilly 2012). Doch wie auch andere ^{18}F -markierte A β -PET-Liganden stellt der relativ geringe Grad der spezifischen Bindung, erkennbar u. a. durch eine starke Bindung an die weiße Hirnsubstanz und resultierend in einer Reduzierung des Kontrastes, eine Limitation dieser Sonde in ihrer Anwendung dar (Benadiba et al. 2012). Als tau-spezifischer PET-Tracer wurde jüngst die Chinolin-Verbindung [^{18}F]THK523 beschrieben, die

zwar noch nicht klinisch erprobt ist, aber aufgrund ihrer *in vitro* als auch *in vivo* dargestellten Tau-Selektivität als vielversprechender AD-Ligand gehandelt wird (Fodero-Tavoletti et al. 2011). PET-Liganden wie ^{18}F -FDDNP weisen zwar A β - und Tau-Selektivität auf, zeigen aber Einschränkungen wie suboptimale Signal-Rausch-Verhältnisse aufgrund unzureichender Spezifität (Small et al. 2006; Luurtsema et al. 2008).

Ein großes Problem aller PET-Sonden liegt in der mit dem Verfahren verbundenen Strahlenbelastung und dem hohen Kostenfaktor der technischen Ausrüstung, was eine routinemäßige Anwendung in der breiten Bevölkerung nur schwer realisierbar macht. Ein neueres, deutlich kostengünstigeres und zusätzlich strahlungsfreies Verfahren stellt dagegen die optische Molekulare Bildgebung mit A β - und/oder Tau-affinen fluorochromen Liganden dar.

2.4 Molekulare Bildgebung von *Morbus Alzheimer* mit fluorochromen Liganden

Gemeinsam ist den jüngst synthetisierten potentiellen AD-Fluorochromen und den beschriebenen molekularen PET-Sonden ihre β -Faltblatt-Affinität. Der genaue Mechanismus der Interkalation der Liganden mit der β -Faltblattstruktur der Targetstrukturen ist noch nicht aufgeklärt. Vermutet wird aber, dass die Liganden mit ihrer Längsachse parallel zur Längsachse der β -Faltblattstruktur der Fibrillen in dünne hydrophobe Bereiche binden (Krebs et al. 2005; Groenning et al. 2007). Eine Steigerung der Fluoreszenzintensität der fluorochromen Liganden nach erfolgter Einlagerung in die A β - und Tau-Fibrillen wird für besonders spezifische Liganden wie beispielsweise Thioflavin T beschrieben und kann als Maß für eine passgenaue Interkalation der β -Faltblattliganden mit ihren Zielstrukturen gesehen werden (Krebs et al. 2005; Groenning et al. 2007). Neben dieser Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome und einer ausreichenden Affinität gegenüber den fibrillären Proteinstrukturen sind die spektroskopischen Eigenschaften der Liganden wie bspw. ein großer Stokes Shift und eine gute Diskriminierung der Fluorochromfluoreszenz vom Umgebungsgewebe für die Fluoreszenzbildgebung der alzhaimerschen Kardinalläsionen ebenso von Bedeutung.

Zusätzlich stellt die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ein unabdingbares Kriterium für potentielle Fluorochrome in der Alzheimerdiagnostik dar. Über Tight Junctions eng

verknüpfte Endothelzellen bilden gemeinsam mit Astrozyten und Perizyten die biologische Barriere, die vielen körperfremden Molekülen nur bedingten Zutritt zum Gehirn gewährt (Ohtsuki 2004; Pardridge 2005; Peppiatt et al. 2006). Neben ausreichender Lipophilie des potentiellen Fluorochroms erhöht auch ein Molekulargewicht kleiner 500 Da die Chance auf Hirngängigkeit (Pardridge 2003). Parameter, die zur Abschätzung der Lipophilie und einer potentiellen Blut-Hirn-Schranke-Passage beitragen können, sind beispielsweise der LogP-Wert und die topologische Oberfläche aller polaren Atome eines Moleküls (TPSA) (Takacsne 1998; Clark 2011).

Da sich Thioflavin T allerdings nicht als hirngängig erwiesen hat, bleibt der Einsatz des sonst spektroskopisch exzellent geeigneten Fluorochroms als Standard für *post mortem*-Färbungen (Stiller et al. 1972) von Alzheimergehirnen beschränkt. Das Fluorochrom Methoxy-X04 ist dagegen ein Amyloid- und Tau-Ligand, der neben günstigen spektroskopischen Eigenschaften (großer Stokes Shift, vielversprechendes Signal-Rausch-Verhältnis) auch durch die Hirnpermeabilität in der Maus überzeugen konnte (Klunk et al. 2002). Allerdings existieren für dieses Fluorochrom bisher nur wenige Informationen zu seiner Biokompatibilität (z.B. erste Hinweise auf einen unzureichenden Abbau von MeX04 im Tierversuch (Klunk et al. 2002)), was allerdings als drittes wichtiges Kriterium für eine *in vivo*-Anwendung unverzichtbar ist.

Dieser Trend zieht sich durch eine Vielzahl der derzeit vorgestellten, synthetisierten fluoreszenten A β - und Tau-Liganden, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Stoffklassen und Anregungs- und Emissionsspektren unterscheiden. Für die neuartige Nahinfrarot-Sonde THK-265 liegen beispielsweise bereits umfassende Daten hinsichtlich der Targetaffinität vor: Neben einem nachgewiesenen K_d-Wert für A β 1-40- und A β 1-42-Fibrillen von $97 \pm 5,0$ nM *in vitro* zeigte der Ligand auch *post mortem* auf humanen Schnitten dementer Gehirne die erfolgreiche Anfärbung von Amyloid-Plaques in Einklang mit der A β -Immunhistochemie als Kontrolle. Nach intravenöser Gabe des Fluorochroms konnten die Amyloid-Plaques nicht nur *ex vivo* mit THK-265 detektiert, sondern auch *in vivo* verstärkte Signale von THK-265 im Kopfbereich transgener Alzheimermäuse im Vgl. zu gesunden Tieren vermessen werden. Damit war auch die Hirngängigkeit des Fluorochroms bewiesen. Wissenschaftliche Erhebungen hinsichtlich der Unbedenklichkeit dieser Sonde beschränkten sich bisher allerdings nur auf eine 7-tägige Beobachtung von mit 10 mg/kg THK-265 intravenös

verabreichten Tieren hinsichtlich des Gewichtsverlustes, der Verhaltensauffälligkeit und der Sterberate (Okamura et al. 2011).

Die großen Defizite in der Erfassung ihrer Biokompatibilität sind eine Ursache, warum der Schritt aus der präklinischen Erprobung der Vielzahl der präsentierten neuen Fluorochrome trotz exzellenter Affinitäten gegenüber Amyloid- und Tau-Fibrillen bisher verwehrt blieb. Hinzu kommt, dass die Übertragung des beschriebenen Alzheimerdiagnosemodells unter dem Gesichtspunkt einer reinen Gehirn-basierten Bildgebung auf den Menschen durch die dicke humane Schädelkalotte und die geringe Eindringtiefe elektromagnetischer Strahlung im UV-VIS-NIR-Bereich limitiert wird.

2.5 Die Retina als vielversprechendes Zielgewebe für die Molekulare Bildgebung von *Morbus Alzheimer*

Im Gegensatz zum Gehirn stellt die Retina als Bestandteil des zentralen Nervensystems mit dem Auge ein deutlich zugänglicheres Zielgewebe dar, das auch eine humane Anwendung der fluoreszenten Sonden realisierbar macht. Während pathologische Veränderungen der Retina wie beispielsweise eine reduzierte Dicke der Nervenfaserschicht und verengte Venen mit verminderter Blutflussrate schon vor einigen Jahren bei Alzheimerpatienten nachgewiesen werden konnten (Berisha et al. 2007), ist das Vorkommen der Kardinalläsionen des *Morbus Alzheimer*, A β und Tau, innerhalb retinaler Schichten erst seit kurzem bekannt.

Dass A β -Plaques in der humanen Alzheimer-Retina schon in frühen Krankheitsstadien auftreten, zeigte erstmalig das Team um Koronyo-Hamaoui (Koronyo-Hamaoui et al. 2011). Zuvor waren in der Linse, im Zytoplasma der Linsenfaserzellen, von Alzheimerpatienten A β 1-40- und A β 1-42-Ablagerungen in gleichen Konzentrationen wie im dementen Gehirn gefunden worden (Goldstein et al. 2003). Tau-Ablagerungen zeigten sich bisher im Bereich der Macula der humanen Alzheimer-Retinae (Ikram et al. 2012). Detaillierte Angaben zu der Verteilung der Ablagerungen in den retinalen Schichten, deren Anreicherung über den Krankheitsverlauf und die genaue Beschaffenheit retinaler Tau-Aggregate im Menschen waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Untersuchungen an AD-Mausmodellen geben allerdings Hinweise darauf, dass Amyloid-Plaques in der Retina erscheinen, bevor sie im dementen Gehirn nachweisbar sind (Koronyo-Hamaoui et al. 2011). Gleichzeitig konnte

gezeigt werden, dass die Belastung der Retina mit amyloiden Plaques mit dem Alter der transgenen Mäuse zunimmt (Koronyo et al. 2012).

Diese Untersuchungsergebnisse bestärken zusammen mit der guten Zugänglichkeit zu Teilen des zentralen Nervensystems über die Retina und der gleichzeitigen Gewöhnung des Auges an Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren Spektralbereich die Einstufung des Retina-Scans mit fluoreszenten A β - und Tau-Liganden als zukunftsweisendes Früherkennungsverfahren zur Alzheimerdiagnose am lebenden Patienten, das aufgrund des geringen Kosten- und Zeitaufwandes auch für die breite Bevölkerung einsetzbar ist. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die geringe Invasivität, die sich auf die bspw. intravenöse Verabreichung des Fluorochroms beschränken würde. Die Untersuchung am Auge kann als nicht-invasiv eingestuft werden. Untersuchungsmethoden am Augenhintergrund werden schon seit Jahren in der Ophthalmologie für die Diagnose und zur Überwachung des Krankheitsverlaufs von Augenerkrankungen eingesetzt. Die konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie, die u. a. für die Erkennung der Altersassoziierten Maculadegeneration genutzt wird (Webb et al. 1987; Bindewald et al. 2005), ist ein Beispiel für den Einsatz von Laserlicht in der retinalen Routinediagnostik. Eine zusätzliche Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen ist die retinale Fluoreszenzangiographie, wie sie mit dem Kontrastmittel Indocyaningrün (ICG) beim Verdacht auf Retina-Schädigungen durchgeführt wird (Hassenstein und Meyer 2009; Pilotto et al. 2013).

Dass auf einem ähnlichen Prinzip des Fundus-Imagings zusätzlich auch der *in vivo*-Nachweis von Amyloid-Plaques in der Retina möglich ist, konnte an transgenen Alzheimermäusen bereits gezeigt werden. Dabei wurde den Tieren über 5 Tage 7,5 mg/kg des A β -Liganden Curcumin intravenös verabreicht und die auf diesem Weg angefärbten Amyloid-Plaques der Mausretina mithilfe eines speziellen Retina-optimierten Fluoreszenzmikroskops, den zugehörigen Detektionsfiltern und einer CCD-Kamera mit hoher Auflösung visualisiert (Koronyo-Hamaoui et al. 2011). In einem anderen transgenen Mausmodell, das humane Tau-Fibrillen in der Retina aufweist, konnte die Tau-Pathologie in der Retina über mehrere Monate *in vivo* mit einer gekoppelten Messtechnik aus konfokaler Scanning-Laser-Ophthalmoskopie und optischer Kohärenztomographie nach der intraperitonealen Applikation von 10 mg/kg (E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (FSB) fluoreszenzbildgebend verfolgt werden (Schön et al. 2012).

2.6 Neuartige Fluoreszenzsonden auf der Basis von Bisstilbenen und asymmetrischen Hemicyaninen

Aufgrund der Neuartigkeit der beschriebenen Bildgebungsmodalität über die Retina sind bisher nur wenige Fluorochrome auf ihre Anwendung am Auge im Hinblick auf die *in vivo*-Alzheimer-Diagnostik untersucht worden. Auch wenn Curcumin sowie FSB in den oben beschriebenen Studien die Realisierbarkeit der retinalen *in vivo*-Alzheimerdiagnostik zeigen konnten, ist ihre Eignung hinsichtlich einer klinischen Zulassung fraglich. Der Naturstoff Curcumin scheint zwar auch in sehr hohen Dosen biokompatibel zu sein (Dhillon et al. 2008), doch seine stark ausgeprägte Lipophilie (Bong 2000) könnte neben einer begrenzten Bioverfügbarkeit (Anand et al. 2007) auch zu unspezifischen Bindungen und Problemen bei der Bereitung einer gut löslichen Darreichungsform für die humane Applikation führen. Zudem überlappt das Fluoreszenzspektrum von Curcumin mit der Autofluoreszenz des Augenhintergrundes, was sich bei der Anwendung am Auge bei nicht ausreichender Diskriminierung nachteilig auf das Signal-Rausch-Verhältnis auswirken könnte.

Für FSB sind bisher nicht genügend Daten zur Biokompatibilität des Fluorochroms erfasst, doch eine Untersuchung konnte bereits zeigen, dass FSB in hohen Dosen nekrotische Veränderungen der Niere verursachen kann (Higuchi et al. 2005). Hinzu kommt, dass FSB ein Derivat des Azofarbstoffs Kongorot ist, welcher laut EU-Gefahrstoffkennzeichnung als giftig eingestuft wird.

Diese unbefriedigende Datenlage erhöht die Nachfrage nach geeigneten, neuartigen fluorochromen Liganden und macht deren Evaluierung unbedingt erforderlich. Aus diesem Bedarf heraus rückten die Stoffklassen der im visuellen Bereich fluoreszierenden Bis(arylvinyl)pyrazine und -pyrimidine sowie der im Nahinfrarotbereich emittierenden asymmetrischen Hemicyanine ins Zentrum des Interesses dieser Arbeit.

Eine Motivation für die Auswahl dieser Fluorochrome ist ihre Anregbarkeit mit Wellenlängen über 400 nm. Die ist zum einen für die Anwendung am Auge vorteilhaft, da die verstärkte Absorption der Linse von kürzeren Wellenlängen in der Bildgebung störend wirken kann (Lerman 1987). Zum anderen kann somit auch die Verwendung von UV-Licht als anregende Lichtquelle vermieden und damit auch das durch UV-Strahlung deutlich erhöhte Risiko für phototoxische Schädigungen am Auge gering gehalten werden (Wegener 1994). Inwiefern diese Fluorochrome sich in ihrem Emissionsspektrum unter physiologischen

Bedingungen mit der Autofluoreszenz des Augenhintergrundes überschneiden und inwiefern eine gute Diskriminierung von dieser möglich ist, ist bisher nicht bekannt. Da es sich bei den ausgewählten asymmetrischen Hemicyaninen allerdings um Fluorochrome im tiefen Rot- und Nahinfrarotbereich handelt und die Eigenfluoreszenz des Augenhintergrundes oberhalb von 600 nm mit zunehmender Wellenlänge abfällt, ist vor allem bei dieser Farbstoffklasse mit einer geringen Überlappung zu rechnen. Neben dieser Nutzung des sogenannten diagnostischen Fensters der optischen Bildgebung profitiert die Bildgebung auch durch höhere Eindringtiefen vom Einsatz tieferer bzw. nahinfraroter Fluorochrome (Weissleder und Mahmood 2001).

Durch die strukturelle Anlehnung der Bis(arylvinyl)pyrazine und Bis(arylvinyl)pyrimidine an Curcumin-abgeleitete Isoxazole und Pyrazole mit bekannter Spezifität zu fibrillären A β 1-42-Aggregaten (Narlawar et al. 2008) und an den A β - als auch Tau-Liganden Methoxy-X04 (Klunk et al. 2002) gelten die ausgewählten Vertreter der pyrazin- und pyrimidinbasierten Bisstilbene als vielversprechende Kandidaten für eine Selektivität gegenüber Amyloid-Plaques und/oder Tau-Fibrillen. Zu Beginn dieser Arbeit waren detaillierte Affinitätsuntersuchungen dieser Stoffklassenvertreter zu den bekannten Alzheimer-Targets noch nicht erforscht. Doch im Laufe dieser Arbeit konnten durch eng kooperierende Verbundpartner (Boris Schmidt, TU Darmstadt) einige Daten zur Targetaffinität der Bis(arylvinyl)pyrazine und Bis(arylvinyl)pyrimidine zusammengetragen werden. Die Erprobung von Vertretern dieser beiden Substanzklassen an humanen AD-Schnitten führte dabei zu sehr guten Färberesultaten von Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündeln hinsichtlich Spezifität, Kontrast und Photostabilität. Zusätzlich konnten für einen Teil der Bis(arylvinyl)pyrazine und Bis(arylvinyl)pyrimidine in einem Thiazinrot-Verdrängungsassay IC₅₀-Werte für Amyloid-Aggregate zwischen 17 und 156 nM, für Tau-Fibrillen zwischen 2 und 17 nM ermittelt werden- die damit mehrheitlich unter den K_d-Werten des β -Faltblattliganden Thiazinrot lagen (K_d(A β): 49 nM, K_d(Tau): 18 nM) (Boländer et al. 2012). Mit einer ähnlichen Substanz wie die in dieser Arbeit gewählten Vertreter der Bisstilbene, BSc4090, konnten bereits *in vivo* Amyloid-Plaques im *Cortex* transgener Mäuse detektiert werden (Boländer et al. 2012). Aufgrund der starken Strukturähnlichkeit, dem damit verbundenen Molekulargewicht und dem zu erwartendem ähnlichen Grad an Lipophilie ist damit auch für die hier ausgewählten

Bis(arylviny)pyrazine und Bis(arylviny)pyrimidine ein Passieren der Blut-Hirn-Schranke bzw. Blut-Retina-Schranke zu erwarten.

Die asymmetrischen Hemicyanine zeichnen sich durch eine Struktur aus, in der jeweils zwei aromatische Aminogruppen über eine in der Länge variierende Polymethinkette verbunden sind. Neben den bereits beschriebenen vorteilhaften spektroskopischen Eigenschaften dieser Fluorochrome im NIR-Bereich zeigten sie zusätzlich eine hohe Photostabilität, Lagerstabilität und Quantenausbeute (Czerney et al. 2004). Dabei beeinflusst die große Anzahl an konjugierten Doppelbindungen die Quantenausbeute positiv, was in der Fluoreszenzbildgebung als förderlich zu werten ist. Dabei steigt allerdings auch gleichzeitig das Molekulargewicht, was hinsichtlich einer erfolgreichen Blut-Hirn/Retina-Passage hinderlich sein könnte. Über die Überwindung von dichten Zell-Zell-Verbänden wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bisher keine Daten für die zwischen 600 und 750 Da großen asymmetrischen Hemicyanine erhoben. Vielversprechend ist dabei allerdings die Modulierbarkeit der Moleküle. Somit kann nicht nur über die Länge der Polymethinkette die Absorptions- und Emissionswellenlänge, sondern auch das Molekulargewicht beeinflusst werden. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, die Moleküle mit einer Carboxylgruppe auszustatten, was bei Betrachtung der im Gehirn befindlichen Monocarboxylat-Transporter die Chance auf eine Blut-Hirn-Schranke-Passage erhöhen könnte (Mac und Nalecz 2003). Bisher ist über die asymmetrischen Hemicyanine bekannt, dass mit der steigenden Anzahl der im Molekül enthaltenen Sulfonsäuregruppen die Hydrophilie positiv beeinflusst werden kann, was sich in der Konsequenz auch auf die Serumproteinbindung auswirkt (Hamann et al. 2011). Daten hinsichtlich des Einsatzes der asymmetrischen Hemicyanine als ungelabelte Sonden für die Detektion von Amyloid- und Tau-Fibrillen existieren nicht.

Detaillierte Übersichten hinsichtlich der Biokompatibilität der Bis(arylviny)pyrazine, Bis(arylviny)pyrimidine und asymmetrischen Hemicyanine liegen derzeit nicht vor. Ergebnisse einer Studie, die sich mit der Zytotoxizität einiger Vertreter der asymmetrischen Hemicyanine auf murine Makrophagen und Endothelzellen beschäftigte, gaben lediglich Hinweise auf eine gute und vor allem bessere *in vitro*-Verträglichkeit der asymmetrischen Hemicyanine im Vergleich zu dem zugelassenen cyaninen Fluorochrom Indocyaningrün (Pauli et al. 2009). Aufgrund des geplanten Einsatzes der neuartigen Fluorochrome für eine

humane Anwendung ist daher für die Zukunft eine breit angelegte Biokompatibilitätsuntersuchung mit der Orientierung auf humane Modellsysteme unabdingbar.

3 ZIELE DER ARBEIT

Die Evaluierung von sensitiven optischen Sonden für die fluoreszenzbasierte *in vivo*-Bildgebung von *Morbus Alzheimer* und damit die Erforschung und Optimierung eines potentiellen Frühdiagnoseverfahrens für den Nachweis neuropathologischer Ablagerungen ist Hauptgegenstand dieser Arbeit. Dabei beschäftigt sich die vorliegende Arbeit vor allem mit der Fragestellung, inwiefern die neuartigen VIS- und NIR-Fluorochrome der Familien der Bis(aryl)vinylpyrazine, Bis(aryl)vinylpyrimidine und asymmetrischen Hemicyanine sich für einen neuen Ansatz der optischen Fluoreszenzbildgebung eignen, der sich auf die Detektion der in der Retina nachgewiesenen neuropathologischen Proteinablagerungen stützt und damit eine nicht-invasive Alzheimerdiagnose über das für optische Bildgebungsverfahren besonders gut zugängliche Auge ermöglicht.

Das erste Hauptziel dieser Arbeit besteht in der Identifizierung geeigneter Fluorochrome mit Selektivität zu den pathologisch veränderten A β - und Tau-Ablagerungen aus einem Pool neuartiger molekularer Sonden und der Prüfung ihrer Eignung für die Fluoreszenzbildgebung. Eine Einschätzung über ihre Eignung in der Fluoreszenzbildgebung am Augenhintergrund soll zunächst die Analyse der spektroskopischen Eigenschaften der Fluorochrome erlauben. Die Bestimmung der Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome mit den Zielstrukturen über die Ermittlung der Fluoreszenzsteigerung der Fluorochrome in Anwesenheit von Amyloid-Fibrillen *in vitro* sowie die Erfassung der Affinität der Fluorochrome über die Quantifizierung des Anteils gebundener Fluorochrommoleküle an fibrilläre Amyloidpeptide *in vitro* sollen Aussagen zur Spezifität der Fluorochrome gegenüber Amyloid-Plaques ermöglichen. Unterschiede in der Targetspezifität sollen dabei unter Berücksichtigung der strukturellen Besonderheiten der Fluorochrome diskutiert werden. Zusätzlich soll unter Verwendung unterschiedlicher Amyloid-Fibrillen (A β 1-40, A β 1-42) bestimmt werden, ob die Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome von der Zusammensetzung der aggregierten A β -Peptide abhängt und im Weitblick abgeschätzt werden, ob sich die Fluorochrome für die Detektion bestimmter mit dem AD-Stadium korrelierenden A β -Aggregationsmuster besonders eignen. Der Fluoreszenznachweis von humanen Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen an mit den Fluorochromen gefärbten AD-Gehirnschnitten *post mortem* soll anschließend die Detektierbarkeit der Fluorochrome auf humanem Material zeigen.

Im Hinblick auf den Einsatz der targetaffinen Fluorochrome für eine humane Anwendung und die dafür unverzichtbare Biokompatibilität stellt die Erforschung der Wechselwirkungen der Fluorochrome mit zellulären Systemen den zweiten Themenkomplex dieser Arbeit dar. Dazu soll zunächst der Einfluss der Fluorochrome auf den Dehydrogenasemetabolismus von nach einer i.v. und i.n. Fluorochrom-Applikation relevanten Zielzellen untersucht werden, da die Dehydrogenaseaktivität mit der Vitalität metabolisch aktiver Zellen korreliert und daher als Maß für die Zytotoxizität herangezogen werden kann. Da beim fluoreszenzbasierten Fundusimaging das Augengewebe simultan mit den Fluorochromen und deren Anregungslaser in Kontakt tritt, sollen dabei zusätzlich Zellvitalitätseinbußen durch die Fluorochrome in Anwesenheit von Anregungslicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Fähigkeit der Fluorochrome, *in vitro* intrazellulär zu akkumulieren und in der Zelle die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu induzieren, sollen erste Hinweise auf mögliche Mechanismen geben, welche die Auslösung von oder den Schutz vor pathophysiologischen, fluorochrominduzierten Prozessen beeinflussen.

Um beurteilen zu können, inwiefern die auf zellulärer Ebene detektierten Interaktionen der Fluorochrome bei der Übertragung der Resultate auf die komplexere *in vivo*-Situation relevant sind, sollen über die Analyse der Expression von Genen stressrelevanter Enzyme wie bspw. antioxidativ wirkende Enzyme oder an der Biotransformation beteiligte Phase-I- und Phase-II-Enzyme wie die Glutathion-S-Transferasen bedeutsame Signalwege identifiziert werden, die während der Fluorochrominkubation möglicherweise zum Schutz der Zelle aktiviert werden können und ihre Metabolisierung und Ausscheidung aus dem Körper unterstützen. Dabei sollen vergleichende Einschätzungen zur Beeinflussung der Genexpression dieser stressrelevanten Enzyme durch ein nicht zytotoxisches, ein potentiell zytotoxisches und ein zytotoxisches Fluorochrom unter Verwendung von Reporter-genexperimenten und qRT-PCR erarbeitet werden. Um neben der Metabolisierung auch weitere pharmakokinetische Prozesse wie die Verteilung und die Ausscheidungswege der Fluorochrome im lebenden Organismus abschätzen zu können, sollen Untersuchungen zur Plasmaproteinbindung der Fluorochrome im zellfreien System sowie Biodistributionsuntersuchungen und die Ermittlung von Bluthalbwertszeiten der Fluorochrome im Tierversuch durchgeführt werden, wodurch zusätzlich auch Informationen über die Bioverfügbarkeit der Fluorochrome gewonnen werden können.

Da die alzheimerrelevanten Neuropathologien in den retinalen Schichten des Auges nur nachgewiesen werden können, wenn die Sonden die Barriere zwischen dem Blut und dem Nervengewebe der Retina überwinden können, ist die Erfassung dieser im Allgemeinen als Hirngängigkeit beschriebenen Fähigkeit der Fluorochrome das dritte Ziel dieser Arbeit. In ersten Voruntersuchungen sollen dabei die Hirngängigkeit beeinflussende Parameter wie das Molekulargewicht, die Polarität und die Ladung der favorisierten Fluorochrome einbezogen werden. Nach weiteren Hinweisen durch ein für die Zellkultur etabliertes Blut-Hirn-Schranke-System soll das Verhalten der Fluorochrome im Hinblick auf ihre Blut-Hirn/Retina-Schranke-Penetration letztendlich *in vivo* mit optischer Fluoreszenzbildgebung nach i.v. Applikation der Fluorochrome im Tierversuch untersucht werden. Ob die Fluorochrome über olfaktorische bzw. trigeminale Transportwege die Blut-Hirn/Retina-Schranke umgehen und so das zentrale Nervensystem auch ohne vorhandene Hirngängigkeit erreichen können, soll die *in vivo*-optische Fluoreszenzbildgebung nach i.n. Applikation der Fluorochrome zeigen. Über die Detektion der Fluorochromfluoreszenz kann *ex vivo* im Gesamtorgan als auch histologisch der Grad der Anreicherung und die Lokalisation der verabreichten Fluorochrome im Gehirn und den Augen bestimmt werden.

Um letztendlich Prognosen über das Potential der Sondenmoleküle als vielversprechende Kontrastmittel für die Alzheimerdiagnostik treffen zu können, sollen sowohl die Vorteile als auch mögliche Limitationen der neuartigen Fluorochrome gegenüber dem unspezifischen, aber bereits klinisch zugelassenen Farbstoff Indocyaningrün als auch den hirngängigen A β - und/oder Tau-Liganden Methoxy-X04 vor allem hinsichtlich der Biokompatibilität analysiert werden.

Schließlich soll das vielversprechendste Fluorochrom aus den getesteten Stoffklassen der Bis(arylvinyl)pyrazine, Bis(arylvinyl)pyrimidine und asymmetrischen Hemicyanine ausgewählt und seine Eignung als Ligand für ein nicht-invasives Frühdiagnoseverfahren von *Morbus Alzheimer* bewertet werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Eine Übersicht der Geräte, die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller mit Firmensitz
Absorptionsspektrometer <i>Ultrospec 4300 pro</i>	GE Healthcare, Freiburg, D
Ansteuerbarer Tisch für Mikrotiterplatte <i>Clean Damper D4CL-5.0, VEXTA</i>	Oriental Motor GmbH, Düsseldorf, D
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Bad Grund, D
Derwargefaß	KGW-Isotherm, Karlsruhe, D
Drehrad-Schüttler <i>stuart® rotator SB3</i>	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Elektrode zur Widerstandsmessung <i>STX-Elektrode</i>	World Precision Instruments, Inc. (WPI), Berlin, D
Eismaschine <i>Ziegra</i>	Dresdner Kühlanlagenbau, Dresden, D
Excitation- and Emissionsfilter für Maestro™: <i>Blue, Green, Yellow, Red, NIR</i>	Cambridge Research & Instrumentation Inc., Woburn, USA
Färbekammer <i>Rotilabo®</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Färbekasten nach Hellendahl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop <i>EVOS fl</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Folienverschweißgerät	Qiagen, Hilden, D
Gasbrenner	schuett-biotec GmbH, Göttingen, D
Glasgefäße	Schott GmbH, Jena, D
Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, D
Isofluranverdampfer <i>Ohmeda Isotec 4</i>	Denner GmbH, Weikersheim, D
Kaltlichtlampe <i>KL2500</i>	Zeiss, Jena, D
Fluoreszenz-Kleintierscanner <i>Maestro™</i>	CRi Inc., Woburn, USA (seit 2011 PerkinElmer, Waltham, USA)
Konfokales Laserscanningmikroskop <i>LSM 510 META</i>	Zeiss, Jena, D
Kryostat <i>CM3050 S</i>	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Laborzange	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, D
Lichtmikroskop <i>BX 50</i>	Olympus, Hamburg, D

Fortsetzung Tab. 1:

Luminometer <i>Lumistar Galaxy</i>	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, D
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Mikrowelle <i>MW1243</i>	Bomann, Kempen, D
NanoDrop™	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
PCR-Cycler <i>peqSTAR 96 Universal Gradient</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PCR-Werkbank	VWR, Darmstadt, D
Phasenkontrastmikroskop <i>EVOS xl</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, CH
Pipetten	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D
Pipettierhilfe <i>pipet boy®</i>	Lab-Laborfachhandel, München, D
Plattenreader <i>TECAN sunrise</i>	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Plattenreader <i>TECAN infinite M200</i>	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Präparierbesteck	Aesculap AG, Tuttlingen, D
Präzisionswaage <i>Kern 440-47N PK</i>	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
qRT-PCR-Gerät <i>Rotor-Gene Q</i>	Qiagen GmbH, Hilden, D
Quarzglasküvetten zur Absorptionsmessung	GE Healthcare, Freiburg, D
Quarzglasküvette zur Fluoreszenzmessung <i>Microküvette + Microcell (3x3 mm)</i>	Jasco, Groß-Umstadt, D
Schüttler <i>Heidolph unimax 2010</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Spectrofluorometer <i>FP-6200</i>	Jasco, Groß-Umstadt, D
Standfuß für 100-Well-Ring	Qiagen, Hilden, D
Ständer für Reaktionsgefäße	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
Thoma-Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ultraschallbad <i>Sonorex RK 52 H</i>	BANDELIN electronic, Berlin, D
Vakuumsauger	HLC BioTech, Bovenden, D
Voltohmeter	World Precision Instruments, Inc. (WPI), Berlin, D
Vortexer <i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries, New York, USA
Wärmekissen <i>ThermoMat PRO 20W Lucky Reptile®</i>	Import Export Peter Hoch GmbH, Waldkirch, D
Wasserbad <i>E100</i>	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Werkbank für steriles Arbeiten <i>Hera safe</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Zellzähler <i>CASY® Model DT</i>	Innovatis AG, Bielefeld, D

Fortsetzung Tab. 1:

Zentrifugen	
<i>Biofuge primo</i>	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich D
<i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
<i>Mini Star Silverline</i>	VWR International GmbH, D
<i>Rotilabo®-Mini-Zentrifuge "Uni-Fuge"</i>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 2 gelistet.

Tab. 2: Auflistung der genutzten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller mit Firmensitz
Amicon®-Ultrazentrifugationsröhrchen Cutoff: 3 kDa	Millipore, Schwalbach, D
Amicon®-Ultrazentrifugationsröhrchen Cutoff: 10 kDa	Millipore, Schwalbach, D
CASY®- cups	innovatis AG, Bielefeld, D
Chamber Slides	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Costar-Wells <i>12 mm Transwell® with 0.4 µm Pore</i> <i>Polyester Membrane Insert</i>	Corning Incorporated, New York, USA
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Eindeckblöckchen <i>Cryomold intermediate</i>	Weckert, Kitzingen, D
Eppendorf LoBind Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Safelock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcon Tubes	Cell star, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Injektionsspritzen <i>Omnican-F</i>	B. Braun, Melsungen, D
Objektträger <i>Superfrost Plus</i>	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	Karl Hecht GmbH & Co KG „Assistent“, Sondheim, D
PCR-Reaktionsgefäße	Qiagen GmbH, Hilden, D
Pipettenspitzen	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, D
Pipettenspitzen mit Filter (Filter Tips)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße, 5 ml	Qiagen GmbH, Hilden, D
Mikrotiterplatten, 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Spezialtierfutter <i>Manganarme Diät</i>	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, D
Spritze <i>Injekt®-H 1 mL Luer Solo</i>	B. Braun, Melsungen, D

Fortsetzung Tab. 2:

Spritzenfilter <i>Fisherbrand® 0,22 µm</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Untersuchungshandschuhe <i>VINYL 2000</i>	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, D
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturschalen Nunc®	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D

4.1.3 Biologisches Untersuchungsmaterial

4.1.3.1 Zelllinien

Für die Zellkulturversuche wurden ausschließlich Zellen humanen Ursprungs verwendet. Die verwendeten Zelllinien sind in Tab. 3 charakterisiert.

Tab. 3: Überblick über die Herkunft der eingesetzten Zelllinien.

Name der Zelllinie	Herkunftsgewebe	Morphologie	Anbieter mit Firmensitz
U-118MG	Neuronales Glioblastom	Gliazellen	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, D
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	Epithel	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, D
HHpC	Leber	Epithel	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
HMEC-1	Vorhaut	Mikrovaskuläres Endothel	Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
HNEpC	Nasenschleimhaut	Epithel	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
HREpC	Niere	Epithel	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
hPC-PL	Plazenta	Mesenchym	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
HUVEC	Nabelschnurvene	Makrovaskuläres Endothel	PromoCell GmbH, Heidelberg, D
NHDF	Haut der Schläfenregion	Bindegewebe (Fibroblasten)	PromoCell GmbH, Heidelberg, D

4.1.3.2 Tiere

Für die Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke-Penetration, Biodistribution und Bestimmung der Bluthalbwertszeit der Fluorochrome wurden 8-12 Wochen alte, immunkompetente NMRI-Nacktmäuse des Stammes *NMRI nude foxn1nu* (Harlan Laboratories GmbH, Eystrup, D) verwendet. Die 72 Tiere waren in einer zertifizierten Einrichtung (Serviceeinheit Kleinnager, Uniklinikum Jena) untergebracht und erhielten Wasser und manganarmes Futter (zur Reduzierung der Autofluoreszenz der Gewebe)

ad libitum. Die Tierversuche wurden zuvor vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz des Freistaates Thüringen genehmigt (Reg.-Nr. 02-064/11).

4.1.3.3 Sonstiges

Einzelheiten zu dem für die A β - und Tau-Selektivitätsuntersuchungen verwendeten Patientenmaterial und den synthetischen Amyloid- β -Peptiden sowie den im Rahmen des Dual-Luciferase-Reportergenassays eingesetzten Vektoren sind in Tab. 4 zu finden.

Die humanen Alzheimerschnitte wurden freundlicherweise vom Klinikum Darmstadt (Zentrum für Pathologie Darmstadt, Dr. Roland Heyny-von Haußen) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Hirnschnitte eines Obduktionsfalles. Für die Obduktion liegt ein Einverständnis mit dem Aufnahmevertrag des Klinikums Darmstadt vor.

Tab. 4: Überblick über weitere in dieser Arbeit verwendeten biologischen Materialien.

Material	Hersteller mit Firmensitz
Humane Gehirnschnitte	
<i>Gewebe:</i> Ammonshorn (Hippocampus)	Institut für Pathologie, Klinikum Darmstadt, Darmstadt
<i>Patient:</i> männlich, 78 Jahre	
<i>Diagnose:</i> <i>Morbus Alzheimer</i> (CERAD-Score C, NFT-Score V nach Braak und Braak (Braak und Braak 1991))	
Humane Alzheimerpeptide	
A β 1-40	INNOVAGEN AB, Lund, S
A β 1-42	INNOVAGEN AB, Lund, S
Verwendete Plasmid-DNA	
Promotorloser Glühwürmchen-Luciferase- Vektor <i>pGL3 Basic</i>	Promega, Mannheim, D
Glühwürmchen-Luciferase-Vektor mit GSTT2-Promotorregion, Variante A <i>pGL3-GSTT2-A</i>	Dr. P. R. Buckland, University of Cardiff, UK (von Prof. Frank Böhmer, Molekulare Zellbiologie, Uniklinikum Jena, zur Verfügung gestellt)

Fortsetzung Tab. 4:

Renilla-Luciferase-Vektor mit CMV-Promotor <i>pRL-CMV</i>	Promega, Mannheim, D
Vektor mit EGFP-Gensequenz unter der Kontrolle eines CMV-Promotors <i>pMAXGFP</i>	Lonza, Basel, CH

4.1.4 Fluorochrome

In der vorliegenden Arbeit wurden Vertreter der Stoffklassen der Bis(arylviny)pyrazine und Bis(arylviny)pyrimidine als VIS-Fluorochrome und asymmetrischen Hemicyanine als NIR-Fluorochrome auf ihre Eignung als biokompatible Alzheimerkontrastmittel untersucht. Die strukturellen Unterschiede der Moleküle sind in Abb. 1 dargestellt.

Die VIS-Fluorochrome wurden von der TU Darmstadt (Prof. Boris Schmidt, Darmstadt, D) zur Verfügung gestellt, die Synthese und Modifikation der NIR-Fluorochrome erfolgte durch die Dyomics GmbH (Jena, D). Ausgehend von der Struktur des NIR-Fluorochroms DY-730 wurde mit DY-630 ein Strukturanalogon geschaffen, das sich durch eine kürzere Polymethinkette und einem daraus resultierenden kleineren Molekulargewicht von DY-730 unterschied. Um mit neutralen Molekülen die Möglichkeit auf eine Blut-Hirn/Retina-Schranke-Penetration zu erhöhen, wurden zusätzlich die auf DY-730 basierenden, neutralen C18-Modifikationen (DY-Mod1, DY-Mod2) synthetisiert.

Als Referenzfluorochrom für die Biokompatibilitätsexperimente, die Plasmaproteinbindung und die *in vitro*- und *in vivo*-Blut-Hirn-Schranke-Penetrationsuntersuchungen wurde das unspezifische, aber klinisch zugelassene Indocyaningrün (ICG) verwendet (PULSION Medical Systems SE, München, D). Das A β - und Tau-affine Fluorochrom Methoxy-X04 (MeX04) (TU Darmstadt, Darmstadt, D) wurde neben den Untersuchungen zur A β -spezifischen Fluoreszenzsteigerung auch bei den Biokompatibilitätstests mitgeführt. Weitere Kontrollfluorochrome dieser Arbeit waren Thioflavin T (gegenwärtig für histologische Färbung der AD-Gehirne genutzt; synthetisiert durch TU Darmstadt, Darmstadt, D) und Curcumin (als Kontrollsubstanz für Blut-Hirn-Schranke-Penetration-Versuch *in vivo*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D).

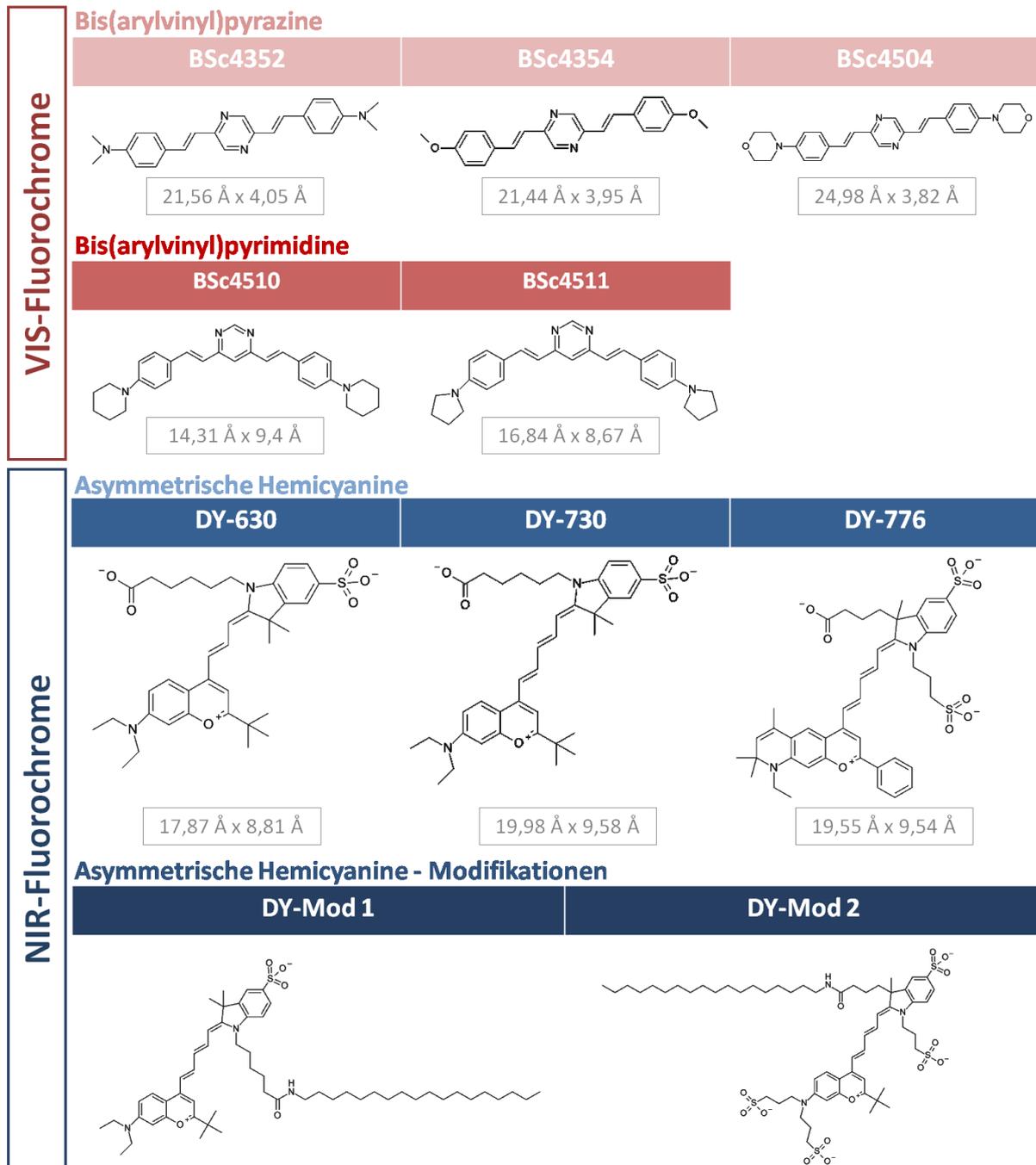


Abb. 1: Strukturen der VIS- und NIR-Fluorochrome, deren Eigenschaften hinsichtlich ihrer Eignung für ein nicht-invasives Frühdiagnoseverfahren für *Morbus Alzheimer* untersucht wurden. Für die Fluorochrom-Grundstrukturen sind die angenommenen Längenmaße des jeweiligen Moleküls in Ångström (Å) angegeben, welche unter Addition der Bindungslängen ermittelt wurden.

4.1.5 Weitere Chemikalien

Die für den experimentellen Teil dieser Arbeit benötigten Chemikalien sind in Tab. 5 nachzulesen.

Tab. 5: Verwendete Chemikalien im Überblick.

Chemikalie	Hersteller mit Firmensitz
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, München, D
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen, Darmstadt, D
Alexa Fluor 543 Phalloidin	Invitrogen, Darmstadt, D
Antibiotika Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, D
Airway Epithelial Cell Growth Medium	Promocell, Heidelberg, D
Aqua dest.	-
Atipamezol	Pfizer, Karlsruhe, D
CASY@ton	innovatis AG, Bielefeld, D
Coelenterazine	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Coenzym A	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
DMEM (Zellkulturmedium)	Gibco/Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
DMEM / F12 (1+1) (Zellkulturmedium)	Gibco/Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
EGTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Eindeckmedium für Gewebeschnitte Permafluor® Mounting Medium	Immunotech, Marseille, Frankreich
Eindeckmedium für Organe Tissue Tek O.C.T. Compound	Paesel & Lorei GmbH, Duisburg, D
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell, Heidelberg, D
Eosin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethanol, vergällt und absolut	Nordbrand Nordhausen GmbH, Nordhausen, D J.T.Baker Europe/ Avantor Performance Materials, Center Valley, USA
Fentanyl	CuraMed, Karlsruhe, D
Flumazenil	Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Fibrinogen (human)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Fibroblast Growth Medium 2	Promocell, Heidelberg, D
FITC-Dextran (FD), 4.000 Da	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
FITC-Dextran (FD), 70.000 Da	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
GlutaMAX™	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Glycyl-Glycin	Merck, Darmstadt, D
Hämatoxylin nach Mayer	Fluka/Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Hank's BSS	PAA Laboratories GmbH, A
Hepatocyte Growth Medium	Promocell, Heidelberg, D

Fortsetzung Tab. 5:

Hoechst 33258	Applichem, Darmstadt, D
Humaner EGF	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Humanes Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Hydrocortison	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
IgG (human)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Isofluran	Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, D
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Kollagen, Type I solution from rat tail	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Luciferin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, D
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Mannitol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
MCDB 131 (Zellkulturmedium)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Medetomidin	Pfizer, Karlsruhe, D
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Midazolam	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Naloxon	Inresa, Freiburg, D
Natriumazid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
n-Octanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Paraformaldehyd, 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Pericyte Growth Medium	Promocell, Heidelberg, D
Poly-L-Lysin 0,01% Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Renal Epithelial Cell Growth Medium 2	Promocell, Heidelberg, D
Rotor-Gene™ SYBR® Green Mastermix	Qiagen, Hilden, D
Salzsäure, 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Stickstoff (flüssig, -198 °C)	Linde AG, Pullach, D
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Trypanblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Trypsin Neutralisation Solution (TNS)	Promocell, Heidelberg, D
Trypsin/EDTA (0,05%)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D

4.1.6 Kits

Vorgefertigte Kits, die für Versuchsdurchführungen zu Hilfe genommen wurden, sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Auflistung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kits.

Kit	Hersteller mit Firmensitz
<i>CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)</i>	Promega GmbH, Mannheim, D
OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit	Cell Biolabs, San Diego, USA
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
RT ² ® First Strand Kit	Qiagen, Hilden, D
RT ² Profiler PCR Array Human Stress & Toxicity PathwayFinder	Qiagen, Hilden, D

4.1.7 Puffer und Lösungen

Bei der Durchführung der Versuche wurden Puffersysteme eingesetzt, deren Zusammensetzungen in Tab. 7 erläutert sind. Für Versuche mit der Verwendung von phosphatgepufferter Salzlösung wurde die 10x-PBS-Lösung mit Aqua dest. zu einer 1fach-konzentrierten Lösung verdünnt.

Tab. 7: Zusammensetzung von eingesetzten Pufferlösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Firefly-Reaktionspuffer	25 mM Glycyl-Glycin 15 mM K ₂ HPO ₄ 15 mM MgSO ₄ 4 mM EGTA 0,05 % NaN ₃ Aqua dest.
Firefly-Substrat	Firefly-Reaktionspuffer 100 mM ATP 20 mM Coenzym A 7,5 mM Luciferin 1 M DTT
PBS (10 x), pH 7,5	0,03 mol/L Kaliumchlorid 1,37 mol/L Natriumchlorid 15 mmol/L Kaliumhydrogenphosphat 80 mmol/L Dinatriumhydrogenphosphat Aqua dest.
Renilla-Reaktionspuffer	1,1 M NaCl 220 mM KH ₂ PO ₄ 22 mM EDTA 130 mM NaN ₃ mit 0,44 mg/mL BSA Aqua dest.

Fortsetzung Tab. 7:

Renilla-Substrat	Renilla-Reaktionspuffer 147 μ M Coelenterazin
Zellysepuffer	1 % Triton X-100 Aqua dest.

4.1.8 Software

Die für die Verarbeitung und Auswertung der generierten Daten genutzten Programme sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Software, die bei der Datenauswertung zum Einsatz kam.

Software	Hersteller mit Firmensitz
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, München, D
Image J	U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA
Zeiss LSM Imager Browser	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
Maestro™ Software 3.0.1	CRi Inc., Woburn, USA (seit 2011 PerkinElmer, Waltham, USA)
Microsoft Office 2010	Microsoft Dtl. GmbH, Unterschleißheim, D
RotorGene Q Software	Qiagen, Hilden, D
Symyx Draw 3.3	Symyx Solutions Inc., Sunnyvale, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Spektroskopische Charakterisierung der Fluorochrome

Um die Absorptionsspektren der Fluorochrome im wässrigen Milieu zu bestimmen, wurden die zuvor in DMSO gelösten Fluorochrom-Stammlösungen mit PBS zu 5 (NIR-Fluorochrome) bzw. 50 μ M (VIS-Fluorochrome) Fluorochromlösungen verdünnt und in einer Quarzküvette spektrophotometrisch mithilfe eines Absorptionsspektrometers vermessen. Die aus dieser Messung resultierende Wellenlänge, bei der die Fluorochromlösung ihr Absorptionsmaximum erreichte, diente als Anregungswellenlänge für die folgende Emissionsmessung am Spectrofluorometer. Die Absorption und Fluoreszenz des Lösungsmittels wurden bei jeder Messung rechnerisch abgezogen.

4.2.2 Bindungsverhalten der Fluorochrome gegenüber Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen

4.2.2.1 Erfassung der Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome mit A β 1-40- und A β 1-42-Peptiden

Um Aussagen über passgenaue Interkalationen der Fluorochrome mit der β -Faltblattstruktur der Amyloid-Plaques treffen zu können, wurde die targetbedingte Fluoreszenzsteigerung der potentiellen Alzheimerfluorochrome in Anwesenheit aggregierter A β -Peptide bestimmt. Zur Gewinnung der für den Versuch notwendigen aggregierten A β -Peptide wurden jeweils 100 μ M Lösung synthetischer A β 1-40- und A β 1-42-Peptide nach einem modifiziertem Protokoll von Lockhart et al. und Wiberg et al. in PBS (pH 7,4) bei 37 °C über einen Zeitraum von 48 h in einem Thermomixer (300 rpm) inkubiert (Lockhart et al. 2005; Wiberg et al. 2010). Im Verhältnis von 1:2 (Fluorochrom:A β -Peptid) wurden BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511, DY-630, DY-730, DY-776 bzw. MeX04 mit den aggregierten A β 1-40- bzw. A β 1-42-Peptiden bei 37 °C (Thermomixer, 1 h, 300 rpm) inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensitäten der Lösungen bestimmt. Dafür wurden Aliquots der Fluorochrom-A β -Peptid-Inkubationslösungen auf für die Fluoreszenzmessung geeignete Mikrotiterplatten pipettiert und unter Berücksichtigung der Absorptions- und Emissionsmaxima des jeweiligen Fluorochroms die Fluoreszenzintensität an einem Fluoreszenzplattenreader vermessen. Zusätzlich zum Fluorochrom-A β -Peptid-Ansatz („*on target*“) wurde für jedes Fluorochrom ein Fluorochrom-Ansatz gleicher Konzentration ohne A β -Peptid („*off target*“) unter den gleichen Bedingungen inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität der reinen Fluorochromlösung wie oben beschrieben ermittelt. Inwiefern eine A β -bedingte Steigerung der Fluoreszenzintensität stattgefunden hatte, wurde nach folgender Formel (Gleichung 1) berechnet:

$$\Delta I = \frac{I_{on\ target}}{I_{off\ target}} \quad (1)$$

Lt. Gleichung 1 ergibt sich der Faktor der A β -bedingten Fluoreszenzsteigerung (ΔI) aus dem Quotienten der gemessenen Fluoreszenzintensität des Fluorochroms nach Bindung an die aggregierten A β -Peptide ($I_{on\ target}$) und der Fluoreszenzintensität des reinen Fluorochroms ($I_{off\ target}$).

4.2.2.2 Bestimmung der Affinität der Fluorochrome zu A β 1-40-Peptiden

Zur Erfassung der Affinität der Fluorochrome zu aggregierten A β 1-40-Peptiden erfolgte die Quantifizierung der A β 1-40-Bindung mittels Ultrazentrifugation. Im Verhältnis von 1:2 (Fluorochrom:A β -Peptid) erfolgte die Inkubation aggregierter A β 1-40-Peptide mit den Fluorochromen BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511, DY-630, DY-730, DY-776 bzw. MeX04. Anschließend wurde 500 μ L der A β 1-40-Fluorochrom-Lösung auf Amicon®-Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben. Die Ultrazentrifugationsröhrchen mit einem Cutoff von 3 kDa erlauben Molekülen mit einem Molekulargewicht unter 3 kDa das Passieren der Röhrchenmembran, während höhermolekulare Strukturen wie beispielsweise das 4,3 kDa große A β 1-40-Peptid, das im aggregierten Zustand bis zu 20 kDa große Aggregate bilden kann (Burdick et al. 1992), im Filtrat verbleiben.

Nach einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 10.000 x g (RT) konnte das Eluat, das ungebundene Fluorochrommoleküle mit einem Molekulargewichte zwischen 0,3 und 0,8 kDa beinhaltete, gewonnen werden. Das Filtrat enthielt die an die aggregierten A β 1-40-Peptide gebundenen Fluorochrome, die aufgrund des größeren Molekulargewichts der A β 1-40-Peptide nicht eluieren konnten. Zur Gewinnung des Filtrates wurde das Ultrazentrifugationsröhrchen umgedreht, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Aliquots der A β 1-40-Fluorochrom-Ausgangslösung, des Eluats und des Filtrats wurden zu je 50 μ L/Well auf eine Mikrotiterplatte pipettiert und der Anteil des vorhandenen Fluorochroms über Absorptions- und Fluoreszenzmessung bei den für das jeweilige Fluorochrom individuellen Wellenlängen mit einem Fluoreszenzplattenreaders bestimmt. Zuvor wurde aus einem Teil der A β 1-40-Fluorochrom-Ausgangslösung eine Verdünnungsreihe hergestellt, deren zugehörige Absorptions- bzw. Fluoreszenzwerte als Grundlage für die Berechnung der Fluorochrommengen in Eluat und Filtrat dienen. Die Menge an Fluorochrom, die im Filtrat detektiert werden konnte, entsprach dabei dem Anteil der Fluorochromlösung in Prozent, der an die aggregierten A β 1-40-Peptide binden konnte. Als Bezugswert diente dabei die Menge an Fluorochrom in der A β 1-40-Fluorochromausgangslösung, die 100 % gesetzt wurde. Um falsch-positive Resultate durch Fluorochrom-Fluorochrom-Aggregationen ausschließen zu können, wurde zusätzlich jedes Fluorochrom unter gleichen Bedingungen ohne die A β -Peptid-Lösung

inkubiert, ultrafiltriert und sein Anteil im Filtrat bestimmt, welcher von den prozentualen Fluorochromanteilen der Fluorochrom-A β 1-40-Filtrate subtrahiert wurde.

4.2.2.3 Detektierbarkeit neuropathologischer Ablagerungen durch NIR-Fluorochrome in humanen Hirnschnitten

Zur Einschätzung der Detektierbarkeit der Amyloid-Plaques und Neurofibrillenbündel mithilfe der NIR-Fluorochrome wurden entparaffinisierte, 4 μ m dicke Gehirnschnitte aus der Hippocampusregion eines AD-Patienten mit 0,001%iger (w/v) ethanolischer Lösung von DY-630, DY-730 bzw. DY-776 für 10 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Färbung mit 1%iger Thioflavin T-Lösung; als Negativkontrolle ein ungefärbter AD-Schnitt. Nach dem Waschen mit Ethanol und Leitungswasser erfolgte mittels 1%iger Essigsäure (w/v) für 15 min die Differenzierung der Gewebsschnitte. Nach einem weiteren Waschschriff mit Leitungswasser (5 min) wurden die Schnitte mit Permafluor® Aqueous mounting medium eingedeckelt und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops unter der Verwendung des DAPI- (Exc.: 357/44 nm; Em.: 447/60 nm), Cy5- (Exc.: 628/40 nm; Em.: 692/40 nm) bzw. Cy7-Filters (Exc.: 710/40 nm; Em.: 775/46 nm) ausgewertet.

4.2.3 Biokompatibilitätsuntersuchungen der Fluorochrome an humanen Zellen

4.2.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der ausschließlich humanen Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Die Zellkulturmedien der permanenten Zelllinien (HepG2: DMEM/F12 1+1; HMEC-1: MCDB 131 + 10 ng/mL hEFG sowie 1 μ g/mL Hydrocortison; U-118 MG: DMEM) wurden mit einem Zusatz von 10 % FKS eingesetzt, die Kultivierung der Primärzellen (HUVEC, HHpC, HNEpC, HREpC, NHDF, hPC-PL) erfolgte dagegen mit einer für jede Zelllinie individuellen Medienzusammensetzung unter niedrigen Serumproteinbedingungen von 0-2,0 % (v/v) (siehe Herstellerhinweise der PromoCell GmbH für die Medien der unter Tab. 3 aufgeführten Primärzellen). Für das Wachstum der primären Leberzelllinie HHpC war eine Beschichtung der Zellkulturgefäße mit 10 μ g/cm² Kollagen notwendig.

Nach gängiger Laborpraxis wurden die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % passagiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden die Zellmonolayer mit 0,05 % Trypsin-EDTA vom Zellkulturgefäß gelöst. Beim Passagieren einer permanenten Zelllinie wurden die abgelösten Zellen anschließend in Zellkulturmedium (Primärzellen in Trypsin-Neutralisationslösung) aufgenommen. Nach dem Einstellen der gewünschten Zellzahl wurden die Zellen in ein neues Zellkulturgefäß überführt und bis zum Versuchsbeginn kultiviert.

Innerhalb der einzelnen Versuche mit Permanentzellen wurde jeweils die gleiche Passagezahl der Zelllinien (Passage 1 bis 10 nach Auftauen) verwendet. Bei den Primärzellen wurden die vom Anbieter empfohlenen Passagezahlen verwendet. Die Anzahl der ausgesäten Zellen innerhalb der Versuche richtete sich nach den empfohlenen Aussaatempfehlungen der Anbieter (siehe Tab. 3) bzw. resultierte aus individuell ermittelten Wachstumskurven der Zelllinien.

Bis auf die Versuche zur Ermittlung des Potentials zur Zellmonolayerpermeation der Fluorochrome mithilfe eines *in vitro*-Blut-Hirn-Schranke-Modells (Zusatz von 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin zu Zellkulturmedium) wurde antibiotikafrei gearbeitet. Mycoplasmenkontaminationen der Zelllinien konnten mit regelmäßigen Mycoplasmentests (PCR) ausgeschlossen werden.

4.2.3.2 Ermittlung des Einflusses der Fluorochrome auf die Dehydrogenaseaktivität humaner Zellen in An- und Abwesenheit von Lichtstrahlung

Da die Bildung der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH durch zelleigene Dehydrogenasen nur in metabolisch aktiven Zellen stattfindet, kann die Dehydrogenaseaktivität als Marker der Zellvitalität bzw. Zytotoxizität herangezogen werden. Mithilfe eines kolorimetrischen CellTiter 96®AQ_{ueous} non-radioactive Cell Proliferation Assays wird Phenazinethosulfat intrazellulär von NADPH bzw. NADH reduziert, woraufhin es außerhalb der Zelle die Reduktion des gelblich gefärbten Tetrazoliumsalzes MTS zum bräunlich gefärbten, wasserlöslichem Formazan induziert, dessen Gehalt photometrisch über eine Absorptionsmessung bei 492 nm ermittelt werden kann und proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen ist.

Um den Einfluss der Fluorochrominkubation auf die Dehydrogenaseaktivität humaner Zellen zu ermitteln, wurden zunächst HepG2-Zellen in 96-Well-Platten über für 24, 48 und 72 h mit 100 fM, 100 pM, 100 nM und 100 µM BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511, DY-630, DY-730, DY-776 sowie den Kontrollfarbstoffen ICG und MeX04 inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen und der Zugabe des MTS-Reagenz erfolgte die Absorptionsmessung bei 492 nm an einem Plattenreader. Die resultierenden Dehydrogenaseaktivitäten wurden auf den Ansatz der unbehandelten Zellen normiert, welcher als Bezugswert auf 100 % gesetzt wurde. Angelehnt an DIN ISO 10993-5:2009 werden resultierende relative Dehydrogenaseaktivitäten zwischen 70 und 120 % (im Vgl. zur unbehandelten Kontrolle) als zytotoxikologisch unbedenklich eingeschätzt. Bei einer relativen Dehydrogenaseaktivität unter 70 % wird von einem zytotoxischen Effekt gesprochen. In dieser Arbeit wurde durch die Einführung einer zusätzlichen Abstufung in potentiell zytotoxische (relative Dehydrogenaseaktivitäten unter Berücksichtigung der Standardabweichungen um den Bereich von 70 % im Vgl. zum Ausgangswert) und stark zytotoxische Substanzen (relative Dehydrogenaseaktivität unter 30 % im Vgl. zum Ausgangswert) eine Differenzierung der zytotoxischen Effekte vorgenommen. Relative Dehydrogenaseaktivitäten weit über 120 % wurden als proliferative Effekte eingestuft.

Zusätzlich wurde für HepG2-Zellen die effektive Konzentration des jeweiligen Fluorochroms ermittelt, bei der die Zellvitalität durch die Fluorochrombehandlung auf 50 % sinkt (EC₅₀). Die resultierende Konzentration wurde zur Einschätzung der Unbedenklichkeit der Fluorochrome herangezogen und diente gleichzeitig als Konzentration für die Zytotoxizitätstests an permanenten HMEC-1, U-118MG und den primären Zelllinien HUVEC, HNEpC, HREpC, NHDF, HHpC und hPC-PL. Sofern im zuvor gemessenen Konzentrationsbereich keine EC₅₀-Dosis ermittelbar war, wurden 100 µM Lösungen des jeweiligen Fluorochroms verwendet.

Da Endothelzellen und Perizyten gemeinsam in nahezu allen Mikrogefäßen vorkommen (Shepro und Morel 1993), wie sie bspw. auch in der Retina auftreten, kommen diese beiden Zelltypen bei einer geplanten Detektion der neuropathologischen Ablagerungen am Augenhintergrund durch die Bestrahlung der Retina zusätzlich zu den Fluorochromen auch mit dem eingesetzten Laser unmittelbar in Kontakt. Aus diesem Grund wurden sowohl Endothelzellen als auch Perizyten in die Untersuchungen zur Ermittlung phototoxischer

Effekte der Fluorochrome eingeschlossen. Die permanenten und primären Endothelzellen (HMEC-1, HUVEC) sowie primäre Perizyten (hPC-PL) wurden separat in 96-Well-Platten ausgesät und mit 100 nM und 100 µM BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511, DY-630, DY-730 und DY-776 behandelt. Als Kontrollen wurden 100 nM und 100 µM ICG sowie 100 nM und 20 µM MeX04 eingesetzt. Nach 1 h Präinkubationszeit wurden die Zellen mithilfe einer Kaltlichtlampe einer Lichtexposition von 2 J/cm² (entsprechend dem Absorptionsmaximum des jeweiligen Fluorochroms) ausgesetzt und weitere 24 h mit den Fluorochromen inkubiert (37 °C, 5% CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) sowie anschließend die relative Dehydrogenaseaktivität wie oben beschrieben ermittelt.

4.2.3.3 Bestimmung der intrazellulären Akkumulation der Fluorochrome mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Ermittlung der intrazellulären Akkumulation der Fluorochrome wurden primäre Endothelzellen (HUVEC) in Poly-L-Lysin-beschichtete 16-Well-Chamber Slides ausgesät und über 48 h mit den Fluorochromen BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511 und DY-630, DY-730 und DY-776 in 100 µM Konzentration (in Zellkulturmedium) inkubiert. Nach PBS-Waschschritten und der Fixierung mit 3,7 % Paraformaldehyd (in PBS) wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert. Für die Anfärbung des Actin-Zytoskeletts wurden die Zellfarbstoffe Alexa Fluor 488 Phalloidin (Exc./Em.: 495/519 nm) und Alexa Fluor 543 Phalloidin (Exc./Em.: 556/570 nm) verwendet, die mit 1 % BSA (w/v) versetzt worden waren um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach einer Färbedauer von 20 min bei RT, einer Nachinkubation mit 1 % BSA (in PBS) für 20 min bei RT und nachfolgenden Waschschritten mit PBS erfolgte die Zellkernfärbung mit 0,2 µg/mL Hoechst 33258 (in Aqua bidest./Permafluor), das gemeinsam mit dem Eindeckmedium auf die Zellen gegeben wurde. Die mikroskopische Auswertung für die VIS-Fluorochrome BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510 und BSc4511 erfolgte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop unter der Verwendung der entsprechenden Anregungs- und Emissionsfilter. Die genaue Lokalisation der Fluorochrome wurde mit der Aufnahme von Z-Stacks (5 µm-Intervall) ermöglicht. Die Detektion der NIR-Farbstoffe DY-630, DY-730 und DY-776 wurde an einem digital invertierten Fluoreszenzmikroskop unter der Verwendung des DAPI- (Exc.: 357/44 nm; Em.:

447/60 nm), Cy5- (Exc.: 628/40 nm; Em.: 692/40 nm) bzw. Cy7-Filters (Exc.: 710/40 nm; Em.: 775/46 nm) durchgeführt.

4.2.3.4 Erfassung des Einflusses der Fluorochrome auf die intrazelluläre ROS-Produktion

Um die Fähigkeit der Fluorochrome zu erfassen, intrazelluläre ROS-Spiegel von Endothelzellen zu beeinflussen, wurden HUVEC in 96-Well-Platten ausgesät und für 48 h mit 100 µM BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511 und DY-630, DY-730 und DY-776 inkubiert. Als Positivkontrolle für die Generation reaktiver Sauerstoffspezies wurde ein Zellansatz mit Wasserstoffperoxid mitgeführt. Zur Detektion der ROS wurden die Zellen nach einem Waschschrift für 45 min bei 37 °C mit 2',-7'-dichlorodihydrofluorescein des OxiSelect™ intracellular ROS Assays inkubiert. Diese zellgängige, nicht-fluoreszente Substanz wird nach der Deacetylierung durch zelleigene Esterasen von intrazellulären ROS zu dem grün fluoreszierendem 2',-7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) oxidiert. Nach weiteren Waschschriften und dem Lysieren der Zellen durch Zellysepuffer (1 % Triton X-100 in HBSS) kann die Menge von DCF über die Fluoreszenzintensität mithilfe eines Fluoreszenzplattenreaders ermittelt werden. Dabei korreliert die gemessene Fluoreszenzintensität von DCF mit dem intrazellulären ROS-Spiegel der Zelle.

Um falschpositive Ergebnisse auszuschließen, wurde zusätzlich zum DCF-Ansatz pro Durchgang ein Fluorochromansatz ohne Zugabe der zellgängigen Hilfssubstanz mitgeführt, dessen „Hintergrundfluoreszenz“ von der gemessenen DCF-Fluoreszenz rechnerisch abgezogen wurde. Zusätzlich wurden die für jedes Fluorochrom erhaltenen Fluoreszenzintensitäten auf die unter gleichen Bedingungen unter Punkt 4.2.3.2 ermittelten Zellvitalitäten normiert um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die unterschiedliche Zellzahl nach Fluorochrominkubation zu vermeiden. Die Angabe der intrazellulären ROS-Spiegel erfolgte als relative ROS-Spiegel in Bezug zu unbehandelten Zellen, deren ROS-Spiegel auf den Wert 1 gesetzt wurde.

4.2.3.5 Untersuchungen zum Einfluss ausgewählter Fluorochrome auf die Genexpression stressrelevanter Enzyme mittels Dual-Luciferase-Reporteranalyse und qRT-PCR

Zur Identifizierung möglicher Verstoffwechselungswege der Fluorochrome wurde im ersten Schritt die Stimulation der Expression des detoxifizierenden Phase-II-Enzyms Glutathion-S-Transferase durch die Fluorochrome in einem Reporterexperiment quantifiziert. Dafür wurde ein Glühwürmchen-Luciferase-Reportervektor (pGL3-GSTT2A) verwendet, dessen Luciferase-Expression durch die klonierte Sequenz des GSTT2-Promotors kontrolliert wurde. So konnte über die Lumineszenz der Glühwürmchen-Luciferase (Em.: 537 nm) die Modulation des GSTT2-Promotors durch die Fluorochrome angezeigt werden. Über einen zweiten Vektor, pRL-CMV, wurde die konstitutive Expression der Renilla-Luciferase (Em.: 465 nm) unter dem Promotor des humanen Cytomegalievirus realisiert und damit experimentelle Schwankungen wie Transfektionseffizienz oder Zellzahl berücksichtigt.

Die transiente Transfektion der 24 h zuvor auf 6-Well-Schalen ausgesäten HUVEC mit den Reportergenkonstrukten erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (4 µg pGL3-GSTT2A; 0,4 µg pRL-CMV). Parallel zum pGL3-GSTT2A-Ansatz wurden die Zellen in einem separaten Ansatz mit dem promotorlosen Leervektor pGL3 transfiziert um die Hintergrundlumineszenz erfassen zu können. Als Transfektionskontrolle diente ein mit dem Plasmid pMAXGFP transfizierter HUVEC-Ansatz, der durch die enthaltene Gensequenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (Em.: 509 nm) die Transfektionseffizienz in Form grün fluoreszierender Zellen widerspiegelte. Nach einer Inkubation von 5 Stunden bei 37 °C wurden die transfizierten Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und am Folgetag mit jeweils 100 µM BSc4352, BSc4510 und DY-730 für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 30 min mit Zellysepuffer (1 % Triton X-100 in HBSS) schüttelnd lysiert. Die Glühwürmchen- und Renilla-Lumineszenzen wurden daraufhin mithilfe eines Luminometers aufgenommen. Um die reelle Aktivität des GSTT2-Promotors zu erhalten, wurde der Quotient aus der Glühwürmchen- und Renilla-Lumineszenzintensität bestimmt. Die Angabe der relativen Promotoraktivität ergibt sich aus der Normierung der mit den Fluorochromen behandelten Proben auf die unbehandelten, transfizierten Zellen.

Zur Erfassung der Modulation einer deutlich größeren Anzahl stressrelevanter Gene durch die Fluorochrome wurde das RT® Profiler PCR Array Human Stress & Toxicity PathwayFinder verwendet. HUVEC wurden in Zellkulturschalen ausgesät und für 48 h mit

100 μ M BSc4352, BSc4510 und DY-730 inkubiert. Anschließend wurde nach Anleitung des RNeasy® Mini Kits die RNA der behandelten Zellen isoliert, mithilfe des RT²® First Strand Kit in cDNA umgeschrieben und die qRT-PCR nach Herstellerhinweisen mithilfe des RT® Profiler PCR Array Human Stress & Toxicity PathwayFinder Assays und des qRT-PCR-Geräts *Rotor-Gene Q* durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C über 10 min, wurden 40 Zyklen mit je einem 15 s langen Denaturierungsschritt (95 °C) und anschließendem Annealingschritt bei 60 °C für 30 s gefahren. Auf der Basis der delta-delta-ct-Methode (Pfaffl 2004) wurden die Fluoreszenzintensitäten in der exponentiellen Phase ausgewertet. Die erhaltene Genexpression der mit den Fluorochromen inkubierten Zellen wurde normiert auf einen unbehandelten Ansatz dargestellt und als Fold Change angegeben.

4.2.4 Untersuchungen zur Abschätzung der Hirngängigkeit der fluorochromen Sonden

4.2.4.1 Ermittlung des Molekulargewichtes, des LogP-Wertes und des TPSA-Wertes

Da neben dem Molekulargewicht auch die Lipophilie einer Substanz ein entscheidendes Kriterium für dessen Hirngängigkeit darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient bzw. der LogP-Wert sowie die topologische Oberfläche der Summe aller polaren Atome (TPSA) der Fluorochrome (BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511, DY-630, DY-730, ICG) als Maß für deren Lipophilie bestimmt. Aufgrund des nicht zufriedenstellenden Bindungsverhaltens gegenüber den Amyloid- und Tau-Fibrillen (siehe 5.2) und z.T. kritischen Wechselwirkungen mit zellulären Systemen (siehe 5.3) wurde das NIR-Fluorochrom DY-776 aus dieser theoretischen Betrachtung und den folgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Die hinsichtlich ihrer Ladung C18-modifizierten DY-730-Fluorochrome DY-Mod1 und DY-Mod2 (siehe 4.1.4) wurden aufgrund der starken zytotoxischen Effekte auf permanente Leber- und Endothelzellen (siehe 5.3) ebenso für die geplanten Versuchsabläufe zur Blut-Hirn-Schranke-Passage nicht mit einbezogen.

Die rechnerische Ermittlung des Molekulargewichtes erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Symyx Draw 3.3, die Berechnung des LogP- und TPSA-Wertes wurde über die Online-Plattform <http://www.molinspiration.com> auf der Grundlage der fragmentbasierten Methode durchgeführt.

4.2.4.2 Einschätzung der Lipophilie der fluorochromen Sonden über die experimentelle Bestimmung des LogP-Wertes

Im Hinblick auf die Erprobung der Hirngängigkeit der Fluorochrome *in vivo* (4.2.4.4) erfolgte die Bestimmung der LogP-Werte von BSc4352 und DY-730 zusätzlich experimentell im Vergleich mit der hirngängigen Substanz Curcumin sowie ICG, das als nicht hirngängig bekannt ist. Dafür wurden wässrigen Lösungen (BSc4352: 100 μM ; DY-730: 50 μM ; Curcumin: 500 μM ; ICG: 50 μM in PBS) jedes der vier Fluorochrome separat mit volumenmäßig gleichen Teilen an n-Octanol für 30 min bei RT in einem Drehrad bei 40 rpm vermischt. Nach der Schüttelinkubation wurde durch die Zentrifugation (550 x g; 15 min) des Octanol-PBS-Gemischs die Phasentrennung beschleunigt. Anschließend wurde sowohl die Octanol- als auch die PBS-Phase vorsichtig abgenommen und separat auf Mikrotiterplatten pipettiert. Über eine für jedes Fluorochrom angefertigte Kalibriergerade und die mit einem Plattenreader gemessene Fluoreszenzintensität des jeweiligen Fluorochroms in der wässrigen und organischen Phase konnte anschließend der Anteil des Fluorochroms in den beiden Phasen ermittelt werden. Die Angabe des Wasser-Verteilungskoeffizienten erfolgte als dessen dekadischer Logarithmus und resultiert aus der Gleichung 2, wobei c_o die Konzentration des jeweiligen Fluorochroms in der organischen (Octanol-)Phase und c_w die Fluorochromkonzentration in der wässrigen Phase darstellt:

$$\log P = \log \frac{c_o}{c_w} = \log c_o - \log c_w \quad (2)$$

4.2.4.3 Ermittlung des Potentials der Fluorochrome zur Permeation durch einen Zellmonolayer mithilfe eines *in vitro*-Blut-Hirn-Schranke-Modells

Um die Fähigkeit der Sonden, Zellmonolayer überwinden zu können, vor Beginn der *in vivo*-Experimente (siehe 3.2.4.4) abschätzen zu können, wurde mit der Endothelzelllinie HMEC-1 ein Blut-Hirn-Schranke-Zellkulturmodell imitiert. Unter Verwendung von 12 mm-Costar Wells wurden HMEC-1-Zellen ausgesät und über einen Zeitraum von 15-20 Tagen bis zum Erreichen eines konfluenten, dichten Monolayers kultiviert. Die Besonderheit der Costar Wells besteht darin, dass Substanzen, die apikal auf den Zellmonolayer gegeben werden (obere Kammer, siehe Abb. 2), bei einer Überwindung des

Monolayers basolateral im Zellkulturmedium (untere Kammer, siehe Abb. 2) detektiert werden können.

Um für die Durchführung der anschließenden Transportstudie einen intakten Monolayer gewährleisten zu können, wurde die Messung des Transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER- *transendothelial electric resistance*) in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Der TEER (Angabe in $\Omega \cdot \text{cm}^2$) dient dabei als verlässliche Größe für die Dichtigkeit der Tight Junctions innerhalb des Endothelzellmonolayers und wurde in dieser Arbeit mithilfe eines Elektroden-Voltometer-Systems ermittelt. Der Messaufbau ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

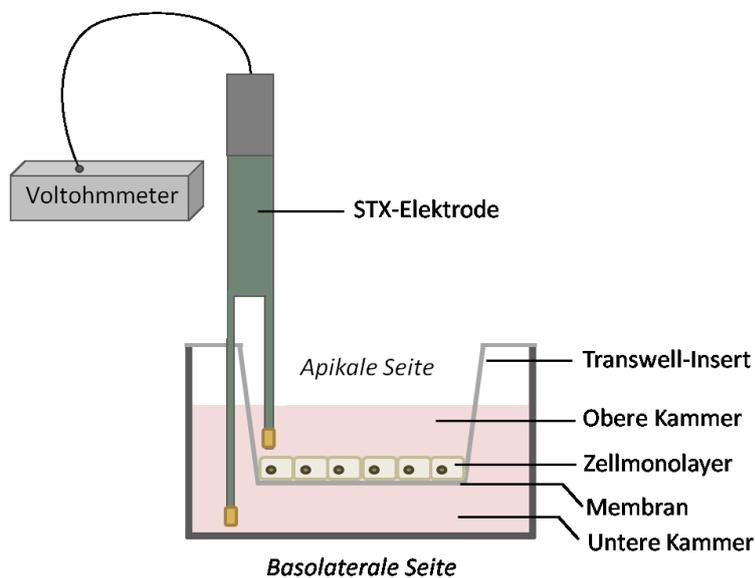


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Costar Wells sowie Messanordnung bei der TEER-Messung.

Bei Erreichen einer konstanten Dichtigkeit des Monolayers wurde das Experiment zur Einschätzung der *in vitro*-Zellmonolayerpermeation der Fluorochrome BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511, DY-630, DY-776 gestartet. Dazu wurde das Zellkulturmedium der oberen Kammer des Costar Wells abgesaugt und auf den Zellmonolayer jedes Costar Wells separat mit 50 μM der oben erwähnten VIS- und NIR-Fluorochrome gegeben. Um vergleichende Einschätzungen zur Zellpermeabilität treffen zu können, wurde zudem ein Ansatz mit 50 μM des nicht membrangängigen ICGs mitgeführt. 30 Minuten nach der Zugabe der Fluorochrome auf den Zellmonolayer wurden aus der unteren Kammer Aliquots auf Mikrotiterplatten pipettiert. Mithilfe eines Fluoreszenzplattenreaders und einer für jedes Fluorochrom aufgenommenen Kalibriergerade konnte unter Berücksichtigung der Anregungs- und Emissionswellenlängen jedes Fluorochroms die Menge der zuvor auf die

Zellmonolayer gegebenen Fluorochromlösung prozentual bestimmt werden, die den Monolayer überwinden konnte. Die daraus resultierende Zellmonolayerpermeation wurde anschließend als prozentualer Wert, bezogen auf die Ausgangslösung, angegeben.

Vor der Zugabe der Fluorochrome in die obere Costarkammer sowie vor und nach der Probenentnahme aus der unteren Costarkammer wurde der TEER-Wert jedes Costar Wells überprüft. Die via Fluoreszenzdetektion ermittelte ausbleibende Permeation des Zellmonolayers von mit den Markermolekülen FITC-Dextran bekannter Größe (4 und 70 kDa; 1 mg/mL) behandelten Costar Wells bestärkte zusätzlich die Annahme eines intakten Zellmonolayers während der beschriebenen Transportstudie.

4.2.4.4 Erfassung der Anreicherung der Fluorochromfavoriten in Auge und Gehirn nach intravenöser und intranasaler Applikation über *in vivo* und *ex vivo* Fluoreszenzmessung

Um die Anreicherung der Fluorochrome in der lebenden Maus und anschließend in den präparierten Organsystemen beobachten zu können, wurde der Fluoreszenz-Kleintierscanner Maestro™ eingesetzt. In diesem Bildgebungssystem trifft das von einer Xenonlampe erzeugte und über einen Bandpassfilter einstellbare Anregungslicht während des Messvorgangs auf das im Geräteinneren gebettete Objekt (Maus, Organe oder Reaktionsgefäße), dessen daraufhin vom vorhandenen Fluorochrom emittierte Fluoreszenzstrahlung mit entsprechenden Emissionsfiltern detektiert werden kann. Die Aufnahme der Emission erfolgt in 10 nm-Intervallen, wodurch sich anschließend durch die so generierten spektralen Informationen die Spektren der jeweiligen Fluorochrome zuordnen und als sogenannte „Komponentenbilder“ anzeigen lassen. Diese Art der spektralen Auflösung, vorher definierte Spektren während der Messung wiederzufinden, ist die Besonderheit des verwendeten Fluoreszenz-Kleintierscanners. So ist auch eine Trennung von Autofluoreszenz-Spektren (bspw. Hintergrundfluoreszenz des Mausgewebes) von der Fluoreszenz der Fluorochrome möglich.

Die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale basiert auf der Erstellung von ROIs (regions of interests), die mithilfe der Maestro™ Software in entsprechenden Körperregionen des Untersuchungsobjektes angelegt werden können. Die Fluoreszenzsignale innerhalb einer ROI werden als Average Signal in scaled counts/s angegeben und zeigen damit die durchschnittliche Fluoreszenzintensität innerhalb einer ROI an, welche im Vergleich

unterschiedlicher ROIs unabhängig von Belichtungszeit, Binning, CCD-Verstärkung, Bittiefe und Pixelanzahl sind.

Um zu untersuchen, inwiefern eine Anreicherung der Fluorochromfavoriten BSc4352 und DY-730 vor allem in der Kopfreion nach intravenöser Applikation fluoreszenzbildgebend möglich ist, wurde Tieren des Stammes *NMRI nude foxn1nu* 10 mg/kg KG BSc4352 bzw. 1 mg/kg KG DY-730 in die Schwanzvene verabreicht. Während jeweils für eine Tiergruppe jedes Fluorochroms nach 0, 5, 10 und 15 Minuten p.i. (n=4) die Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen erfolgte, wurde eine zweite Tiergruppe 0, 0,5, 1, 2 und 4 h Stunden nach der Injektion (n=4) im Fluoreszenz-Kleintierscanner hinsichtlich ihrer Ganzkörperfluoreszenz vermessen. Das Hauptaugenmerk bei der Messung stellte die Kopfreion dar. Die Tiere wurden 15 min bzw. 4 h p.i. abgetötet und das Gehirn sowie die Augen präpariert. Die Detektion der sich in den Organen angereicherten Fluorochrome wurde ebenso im Fluoreszenz-Kleintierscanner Maestro™ durchgeführt.

Um einschätzen zu können, wie sich die Fluoreszenzsignale im Kopfbereich darstellen, wenn die Fluorochrome die Blut-Hirn-Schranke erfolgreich passiert haben, wurde eine Mausgruppe mitgeführt, denen zusätzlich zum Fluorochrom BSc4352 eine wässrige 1,6 M Mannitollösung injiziert wurde. Als hyperosmolare Lösung bewirkt Mannitol einen osmotischen Effekt in den Endothelzellen, in dessen Folge die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke an Volumen verlieren und durch die entstehenden Zugkräfte die sonst starken Tight Junction transient gelockert werden (Rapoport 2000). Somit kann die Endothelzellschicht überwunden und der Zugang zum Gehirn freigegeben werden.

Weitere Kontrollgruppen bildeten Tiergruppen (jeweils n=4), die 1 mg/kg KG ICG i.v. verabreicht bekamen. Von dem klinisch zugelassenen Kontrastmittel, das vor allem in der Gefäßdarstellung Anwendung findet (Brown und Strong 1973; PULSION 2012), ist kein Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke bekannt. Zwei weitere Tiergruppen (jeweils n=4) wurde 10 mg/kg KG Curcumin verabreicht, um die Fluorochromanreicherung einer hirngängigen Kontrollsubstanz (Koronyo-Hamaoui et al. 2011) beobachten zu können.

Während der Applikation und Fluoreszenzmessungen standen die Tiere unter 2%iger Isoflurannarkose.

Um zu überprüfen, ob die Fluorochrome BSc4352 und DY-730 auf olfaktorischem bzw. trigeminalem Weg die Blut-Hirn-Schranke umgehen und dennoch die Zielorgane erreichen

können, wurden beide Fluorochrome separat in einer Dosis von 1 mg/kg KG intranasal verabreicht. Da in diesem Fall eine Inhalationsnarkose hinderlich ist, wurden die Mäuse für die Applikation mit einer Mixtur aus Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) *i.p.* betäubt. Die Applikation der Fluorochrome erfolgte über das wechselseitige Tropfen von 20 µL Fluorochromlösung in die Nasenlöcher. Die Tiere, die BSc4352 und DY-730 intranasal erhielten, wurden in 2 Gruppen unterteilt. Während die Fluorochromfluoreszenz *in vivo* in der einen Tiergruppe (n=4) nach 0, 5, 10 und 15 Minuten *p.a.* beobachtet wurde, wurde die *in vivo* Fluoreszenzmessung der zweiten Mausgruppe (n=4) nach 0, 0,5, 30, 1, 2, 4, 8 und 24 h durchgeführt. Die Tiere wurden hierbei in Bauchlage mit besonderer Berücksichtigung der Kopfregeion und seitlich liegend zur Erfassung der Fluoreszenz im Auge aufgenommen. Nach 15 min bzw. 24 h *p.a.* wurden die Tiere abgetötet und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der zuvor präparierten Gehirne und Augen am Fluoreszenz-Kleintierscanner Maestro™ aufgenommen. Die Tiere, die länger als 15 min hinsichtlich ihrer Ganzkörperfluoreszenz beobachtet wurden, wurden 30 min *p.a.* subkutan mit dem Antidot-Gemisch Atipamezol (2,5 mg/kg KG), Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Naloxon (1,2 mg/kg KG) aus der Narkose geholt und für weitere Messungen mit 2%iger Isoflurannarkose betäubt. Kontrolltiere erhielten intranasal das nicht hirngängige ICG sowie FITC-Dextran (4 kDa), von dem das Vordringen in Bereiche des zentralen Nervensystems auf nasalem Weg angenommen wird (Talegaonkar und Mishra 2004) (jeweils 1 mg/kg KG; n=4). Ein Überblick über alle im *in-vivo*-Versuch verwendete Tiergruppen unter der Angabe der verwendeten Maestro™-Filtersysteme ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Überblick über die für die *in vivo*-Fluoreszenzbildgebung verwendeten Tiergruppen. Jede Tiergruppe setzte sich aus 4 Individuen zusammen. Bei der Nutzung des Fluoreszenz-Kleintierscanners wurden folgenden Filtersysteme verwendet: Blau: Exc.: 445-490 nm, Em.: ab 515 nm; Grün: Exc.: 503-555 nm, Em.: ab 580 nm; Rot: Exc.: 615-665 nm, Em.: ab 700 nm; NIR: Exc.: 710-760 nm, Em.: ab 800 nm.

Verabreichtes Fluorochrom	Verabreichte Dosis	Beobachtungszeitraum	Verwendetes Filtersystem
Intravenös verabreichte Fluorochrome			
BSc4352	10 mg/kg KG	15 min	Blau
BSc4352	10 mg/kg KG	4 h	Blau
BSc4352 + Mannitol	10 mg/kg KG	15 min	Blau
BSc4352 + Mannitol	10 mg/kg KG	4 h	Blau
DY-730	1 mg/kg KG	15 min	Rot
DY-730	1 mg/kg KG	4 h	Rot

Fortsetzung Tab. 9:

Curcumin	10 mg/kg KG	15 min	Blau
Curcumin	10 mg/kg KG	4 h	Blau
ICG	1 mg/kg KG	15 min	NIR
ICG	1 mg/kg KG	4 h	NIR
Intranasal verabreichte Fluorochrome			
BSc4352	1 mg/kg KG	15 min	Blau
BSc4352	1 mg/kg KG	24 h	Blau
DY-730	1 mg/kg KG	15 min	Rot
DY-730	1 mg/kg KG	24 h	Rot
FITC-Dextran	1 mg/kg KG	15 min	Grün
ICG	1 mg/kg KG	24 h	NIR

4.2.4.5 Histologischer Nachweis und Lokalisation der *in vivo* applizierten Fluorochrome in Augen- und Hirngewebe

Um die Verteilung der Fluorochrome im Gewebe detektieren und lokalisieren zu können, wurden 20 µm dicke Frontalschnitte der unter 4.2.4.4 präparierten Gehirne (unterteilt in *Bulbus olfactorius*, *Telencephalon* und *Cerebellum*) bzw. 14 µm dicke Frontalschnitte der Augen für die mikroskopische Auswertung mit Aceton fixiert und die Zellkerne mit 0,2 µg/mL Hoechst angefärbt. Die Detektion der Fluorochrome erfolgte an einem digital invertierten Fluoreszenzmikroskop unter der Verwendung von an die Fluorochrome angepassten Anregungs- und Emissionswellenlängen. Zur Lokalisation der betrachteten Schnittbereiche wurde parallel zu jedem unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachteten Schnitt ein weiterer Gewebeschnitt aus schnittnahen Bereichen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und an einem Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

4.2.5 Untersuchungen zur Verteilung und den Ausscheidungswegen der Fluorochrome

4.2.5.1 Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration

Um die Affinität der Fluorochrome gegenüber humanen Plasmaproteinen beurteilen zu können, wurden die im humanen Blutplasma mengenmäßig häufig vorkommenden Proteine Albumin, IgG und Fibrinogen separat zu gleichen Teilen mit den Fluorochromen BSc4352, BSc4354, BSc4511, DY-630 und DY-730 sowie ICG bei 37 °C und 300 rpm für 1 h in einem Thermomixer inkubiert. Danach erfolgte die Ultrazentrifugation mittels Amicon®-

Ultrazentrifugationsröhrchen (Cutoff von 10 kDa), bei der die Fluorochrome, die an das jeweilige Plasmaprotein gebunden haben, aufgrund des großen Molekulargewichts der Plasmaproteine (Albumin: 60 kDa, IgG: 150 kDa, Fibrinogen: 340 kDa) im 10 kDa-porigem Filter zurückgehalten wurden. Die anschließende Detektion der Fluorochrome in Eluat und Filtrat erfolgte wie es bereits unter Punkt 4.2.2.2 detailliert beschrieben wurde. Die Bindung an das entsprechende Plasmaprotein korreliert dabei direkt mit dem im Filtrat wiedergefundenen Fluorochrom der Protein-Fluorochromlösung und wurde als Prozentwert angegeben.

4.2.5.2 Ermittlung der Biodistribution nach intravenöser und intranasaler Applikation von selektierten Fluorochromfavoriten

Um die Verteilung der intravenös und intranasal applizierten Fluorochrome (BSc4352, DY-730, Curcumin, ICG, FITC-Dextran) im Körper zu untersuchen, wurden während der Präparation der unter 4.2.4.4 beschriebenen Tiergruppen neben dem Gehirn und den Augen auch die Leber, die Nieren, die Milz, der Dünndarm, die Lunge, das Herz und ein Teil des Oberschenkelmuskels entnommen. Die Ermittlung der Fluorochromgehalte in den Organen erfolgte semiquantitativ über die Messung der Fluorochromfluoreszenz mit dem Fluoreszenz-Kleintierscanner Maestro™ wie bereits zuvor für das Gehirn und die Augen beschrieben wurden (siehe 4.2.4.4). Dabei wurden für jedes Organ standardisierte ROI-Größen verwendet.

4.2.5.3 Bestimmung der Bluthalbwertszeit selektierter Fluorochromvarianten über die semiquantitative Vermessung der Fluorochromfluoreszenz im Auge *in vivo*

Die semiquantitative Auswertung von über das Auge aufgenommenen Fluoreszenzdaten ermöglicht die Beobachtung der Kinetik i.v. verabreichter Fluorochrome und damit die Bestimmung deren Bluthalbwertszeit (Dobosz et al. 2011). Diese Methode ist allerdings nur für Fluorochrome realisierbar, die sich nicht unspezifisch im Augengewebe anlagern. Um Hinweise zur Pharmakokinetik der sich nur in der Länge der Polymethinkette unterscheidenden NIR-Farbstoffe DY-630 und DY-730 zu erlangen, wurde jeweils 3 Mäusen (*NMRI nude foxn1nu*) das jeweilige Fluorochrom in einer Dosis von 1 mg/kg KG i.v. verabreicht. Unmittelbar nach der Injektion wurden die im Auge eintreffenden Fluoreszenzsignale in 20 s-Intervallen mithilfe des Fluoreszenz-Kleintierscanners Maestro™

aufgenommen, während die mit 2%iger Isoflurannarkose narkotisierte Maus mit dem Fokus auf das Auge seitlich liegend gebettet wurde. Nachdem die anfänglichen Fluoreszenzsignale ihren halbmaximalen Wert erreichten (ab ca. 15 min), wurden die Messintervalle auf 5 min verlängert und mit weiterer Fluoreszenzabnahme bis zur Auswaschung nach 4 h *p.i.* nur noch im 1 h-Rhythmus die Augenfluoreszenz aufgenommen. Die Fluoreszenzsignale wurden anschließend gegen die Zeit aufgetragen und über eine den Zeitverlauf beschreibende Exponentialgleichung der Zeitpunkt berechnet, an dem halbmaximale Fluoreszenzsignale (vgl. Ausgangswert zum Zeitpunkt 0) erreicht wurden.

4.2.6 Statistik

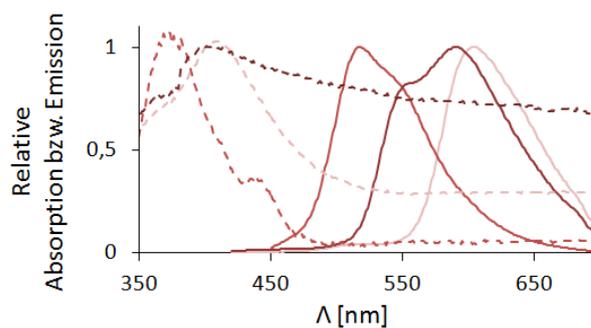
Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Darstellung der *in vitro*-Versuche als Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei biologisch unabhängigen Experimenten. Mithilfe eines zweiseitigen, abhängigen t-Tests wurden die Signifikanzen ermittelt ($p < 0.05$ = signifikant (*), $p < 0.01$ = hoch signifikant (**), $p < 0.001$ = höchst signifikant (***)).

5 ERGEBNISSE

5.1 Spektroskopische Charakterisierung der Fluorochrome

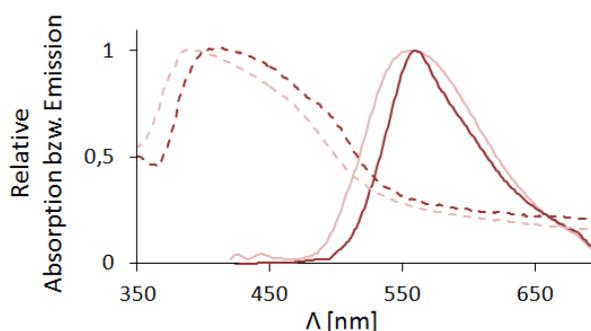
Nach der spektroskopischen Vermessung der Fluorochrome im wässrigen Milieu konnte eine Klassifizierung der Bis(arylvinyl)pyrazine und Bis(arylvinyl)pyrimidine als VIS-Fluorochrome erfolgen. Auffallend bei allen fünf zur Familie der Bisstilbene gehörenden Fluorochromen war ein besonders großer Stokes-Shift: Während alle Fluorochrome dieser Familie im sichtbaren blauen Wellenlängenbereich ihr Absorptionsmaximum erreichten, emittierten die Fluorochrome elektromagnetische Strahlen im grünen (BSc4354), gelben (BSc4510, BSc4511) und roten (BSc4352, BSc4504) Wellenlängenbereich (Abb. 3).

Bis(arylvinyl)pyrazine



	Abs _{max}	Em _{max}
BSc4352	400 nm	603 nm
BSc4354	364 nm	517 nm
BSc4504	400 nm	590 nm

Bis(arylvinyl)pyrimidine



	Abs _{max}	Em _{max}
BSc4510	385 nm	558 nm
BSc4511	400 nm	559 nm

--- Absorption
— Emission

Abb. 3: Absorptions- und Emissionsspektrum und Absorptions/Emissionsmaxima der Bis(arylvinyl)pyrazine und Bis(arylvinyl)pyrimidine (VIS-Fluorochrome). Die dargestellten Spektren beziehen sich auf eine wässrige Lösung der Fluorochrome.

Für die asymmetrischen Hemicyanine konnten Anregungs- und Emissionsspektren im roten (DY-630) und nahinfraroten (DY-730, DY-776) Bereich, dargestellt in Abb. 4, ermittelt werden.

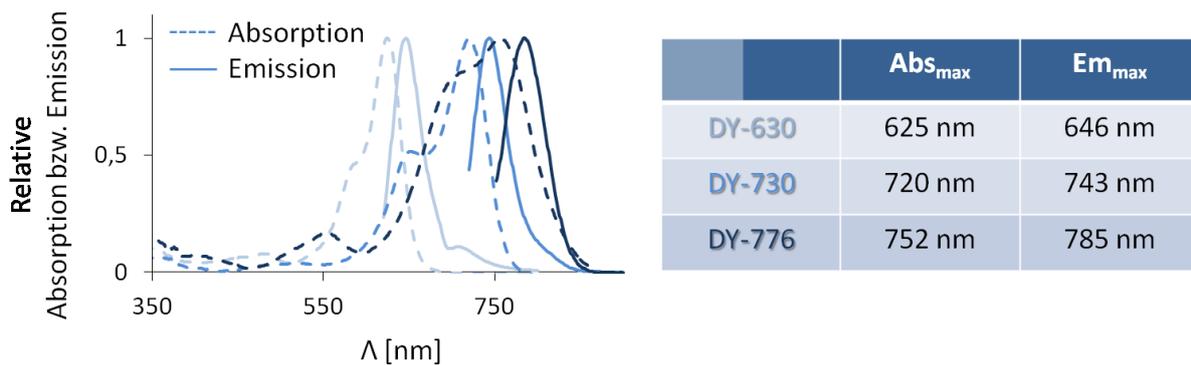


Abb. 4: Absorptions- und Emissionsspektrum und Absorptions/Emissionsmaxima der asymmetrischen Hemicyanine (NIR-Fluorochrome). Die dargestellten Spektren beziehen sich auf eine wässrige Lösung der Fluorochrome.

5.2 Bindungsverhalten der Fluorochrome gegenüber Amyloid- und Tau-Fibrillen

5.2.1 Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome mit A β 1-40- und A β 1-42-Peptiden

Bei allen VIS-Fluorochromen konnte eine durch die Interkalation mit den A β -Peptiden verursachte Fluoreszenzsteigerung verzeichnet werden, wobei die Vertreter der Bis(arylviny)pyrimidine, BSc4510 und BSc4511, mit einer Steigerung der Fluoreszenzintensität um den Faktor $1,8 \pm 0,1$ bzw. $1,7 \pm 0,1$ (A β 1-40) und $1,9 \pm 0,1$ (A β 1-42) die stärksten Effekte erzielten ($p < 0,01$). Eine signifikante Präferenz für aggregierte A β 1-42-Peptide gegenüber A β 1-40-Peptiden konnte dabei für das Fluorochrom BSc4511 festgestellt werden. Die Bis(arylviny)pyrazine BSc4352, BSc4352 und BSc4504 zeigten tendenziell höhere relative Fluoreszenzsteigerungen in Anwesenheit von A β 1-40 als nach der Interkalation mit A β 1-42-Aggregaten (BSc4352: $1,5 \pm 0,2$; BSc4354: $2,6 \pm 0,7$; BSc4504: $1,6 \pm 0,0$ relative Fluoreszenzsteigerung nach Bindung an A β 1-40), wobei eine Signifikanz dieser Präferenz nur für BSc4504 nachzuweisen war (Abb. 5).

Den stärksten fluoreszenzsteigernden Effekt unter den NIR-Fluorochromen erreichte DY-730 (A β 1-40: $1,6 \pm 0,1$; A β 1-42: $1,4 \pm 0,0$). Bei DY-630 blieb einer Steigerung der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von A β 1-40 bzw. A β 1-42 aus. Höchst signifikante Fluoreszenzsteigerungen ($p < 0,001$) zeigte das mitgeführte Referenzfluorochrom MeX04, das nach Bindung an A β 1-40 relative Fluoreszenzsteigerungen um den Faktor $11,0 \pm 0,3$ und für A β 1-42 um $5,5 \pm 0,2$ erlangte. Dabei waren die durch die Interkalation mit A β 1-40 erzielten

on target-Fluoreszenzen bei DY-730 signifikant und MeX04 höchst signifikant stärker als nach einer A β 1-42-Interkalation (Abb. 6).

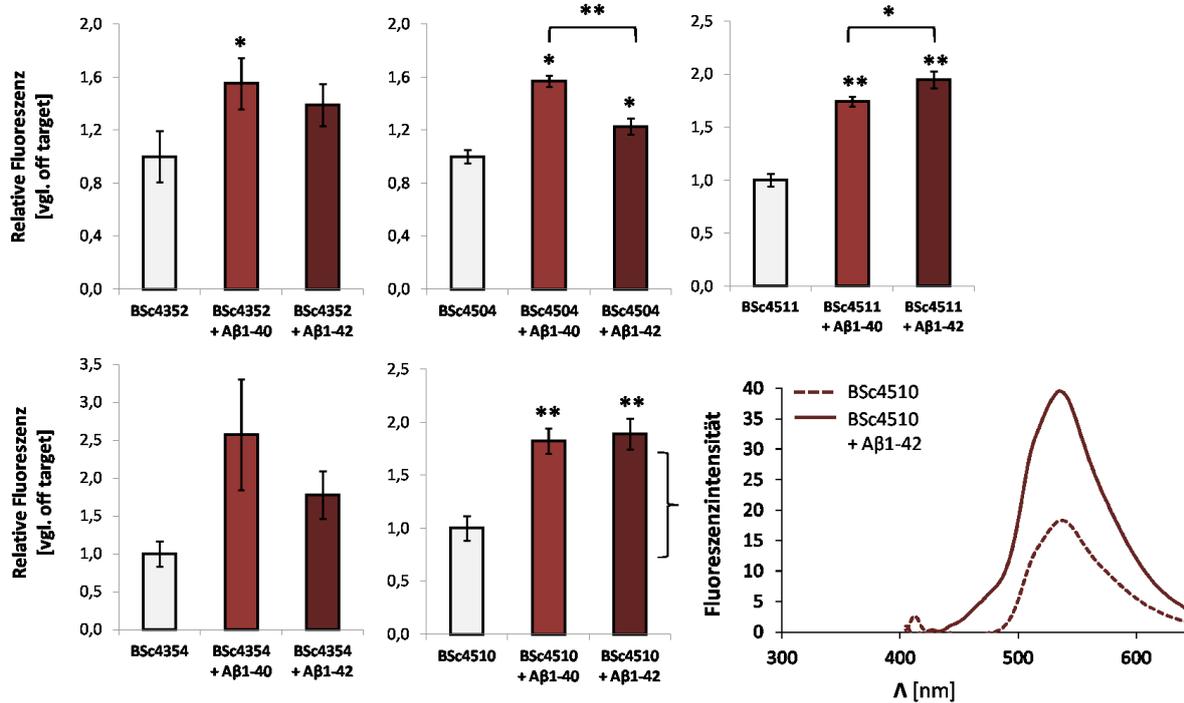


Abb. 5: Bis(arylvinyl)pyrimidine erfuhren durch die Interkalation mit A β 1-40- und A β 1-42-Peptiden hoch signifikante Fluoreszenzsteigerungen. Die A β 1-40- und A β 1-42-bedingte Intensitätssteigerung der Fluorochromfluoreszenz (MW \pm STAB, n=3) ist relativ zur Fluoreszenz der Fluorochrome in Abwesenheit der A β -Peptide dargestellt. Vorhandene Signifikanzen zeigen den Vergleich der „on target“-Fluoreszenz jedes Fluorochroms im Bezug auf seine „off target“-Fluoreszenz bzw. die Fluoreszenzsteigerung in Anwesenheit von A β 1-40 verglichen mit der durch eine A β 1-42-Interkalation verursachte Fluoreszenzsteigerung (eckige Klammer) (t-Test; * p < 0,05: signifikant; ** p < 0,01: hoch signifikant; *** p < 0,001: höchst signifikant). Beispielhaft ist unten rechts das Fluoreszenzspektrum von BSc4510 in Abwesenheit (gestrichelte Linie) und Anwesenheit von A β 1-42 (durchgängige Linie) dargestellt.

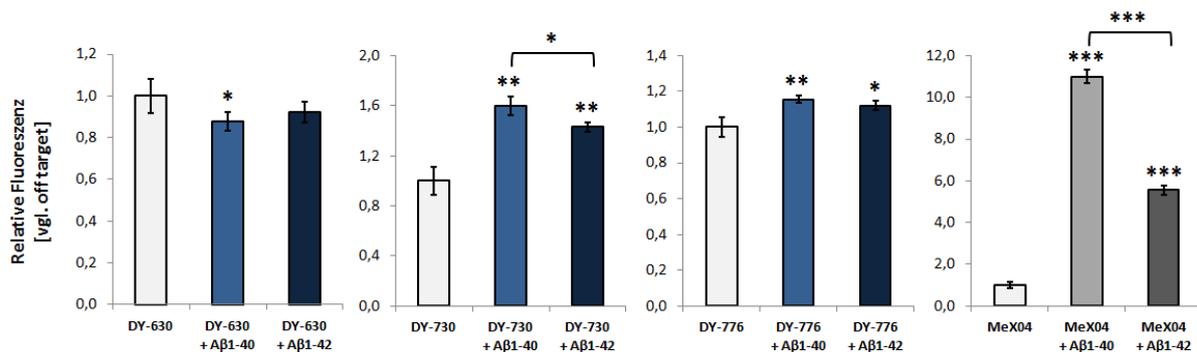


Abb. 6: DY-730 zeigte die beste Interkalationsfähigkeit der NIR-Fluorochrome. Die Fluoreszenz von DY-630, DY-730 und DY-776 und des Referenzfluorochroms MeX04 (MW \pm STAB, n=3) wurde jeweils separat verglichen mit der jeweiligen Fluorochromfluoreszenz nach der Interkalation der Fluorochrome mit aggregierten A β 1-40 und A β 1-42-Peptiden. Der statistische Vergleich der „on target“-Fluoreszenzen mit den „off target“-Fluoreszenzen sowie der A β 1-40-Interkalation und der

A β 1-42-Interkalation (eckige Klammer) erfolgte mittels t-Test, (* $p < 0,05$: signifikant; ** $p < 0,01$: hoch signifikant; *** $p < 0,001$: höchst signifikant).

5.2.2 Affinität der Fluorochrome zu A β 1-40-Peptiden

Die Betrachtung der unter 5.2.1 beschriebenen Ergebnisse im Vergleich zur mittels Ultrazentrifugation ermittelten quantitativen Bindung der Fluorochrome an A β 1-40 (siehe 4.2.2.2) ergab, dass Fluorochrome, die eine besonders starke A β 1-40-bedingte Steigerung der Fluoreszenzintensität zeigten, im Vergleich zu den anderen Fluorochromen nicht automatisch auch die höchste prozentuale Bindung an A β 1-40 aufwiesen (Abb. 7). Die VIS-Fluorochrome BSc4352, BSc4504, BSc4510 und BSc4511 erzielten Affinitätswerte von 51 ± 5 % (BSc4352), 50 ± 5 % (BSc4504), 51 ± 7 % (BSc4510) und 44 ± 12 % (BSc4511), die damit deutlich über denen von MeX04 (34 ± 11 %) lagen. Das NIR-Fluorochrom DY-630, das unter 5.2.1 keine A β 1-40-bedingte Fluoreszenzsteigerung zeigte, erlangte eine Bindung an A β 1-40 von 14 ± 5 %.

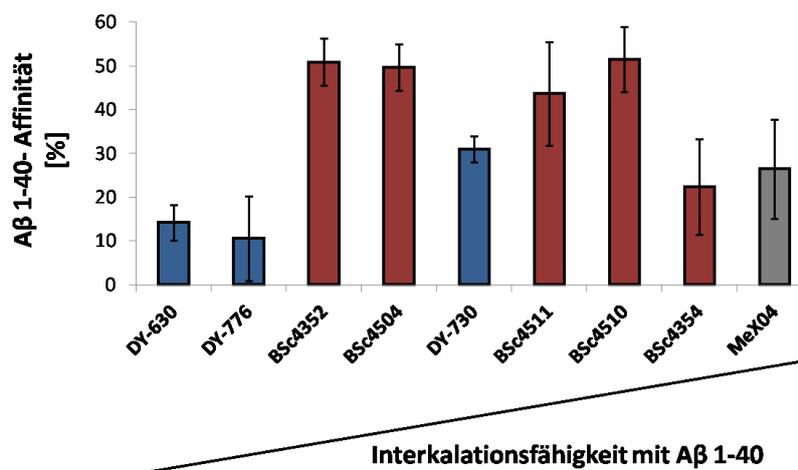


Abb. 7: Vergleichende Darstellung der A β 1-40-Affinität der VIS-Fluorochrome, NIR-Fluorochrome und des Referenzfluorochroms MeX04 mit ihrer A β 1-40-Interkalationsfähigkeit. Die VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) sowie das Referenzfluorochrom MeX04 (grau) sind aufsteigend nach der ermittelten on target(A β 1-40)-Fluoreszenz geordnet. Die quantifizierte A β 1-40-Bindung ist hier als A β 1-40-Affinität (MW \pm STABW, n=3) definiert, wurde mittels Ultrazentrifugation ermittelt und stellt den prozentualen Anteil der zuvor zu den A β 1-40-Peptiden gegebenen Fluorochromausgangslösung dar, der an die aggregierten A β 1-40-Peptide binden konnte. Die Interkalationsfähigkeit wurde über die A β 1-40-bedingte Fluoreszenzsteigerung (siehe 5.2.1) ermittelt.

5.2.3 Detektierbarkeit neuropathologischer Ablagerungen durch NIR-Fluorochrome an humanen Hirnschnitten

Mit allen 3 NIR-Fluorochromen (DY-630, DY-730, DY-776) konnte der Fluoreszenznachweis von A β -Plaques humaner AD-Hippocampuschnitte (Region: *Cornu Ammonis*) erzielt werden (Abb. 8). Auffallend war dabei, dass der beste Kontrast zum Umgebungsgewebe bei der Betrachtung im DAPI-Filter erreicht werden konnte. Genauso wie die Referenzsubstanz Thioflavin T zeigte hierbei vor allem DY-630 eine spezifische Färbung der Plaques mit guter Differenzierung vom Hintergrundgewebe, was die Sichtbarmachung der Plaquestruktur und vor allem des Plaque-Kerns ermöglichte. Eine vergleichsweise schwächere Fluoreszenzintensität von DY-730 resultierte in einem im Vgl. zu DY-630 ungünstigerem Kontrast zum restlichen Gewebe. Eine besonders starke unspezifische Färbung des Umgebungsgewebes mit DY-776 führte bei der Betrachtung der mit DY-776 gefärbten Schnitte im NIR-Filter zu einer ungenügenden Unterscheidung der Plaquestruktur vom restlichen Gewebe. Für DY-630 und DY-730 konnten die extraneuronalen Plaques partiell in Randbereichen im Nahinfrarotbereich nachgewiesen werden, wobei hierbei die Färbung mit DY-730 im Vergleich zu DY-630 eine deutlichere Darstellung der Plaquestruktur zuließ.

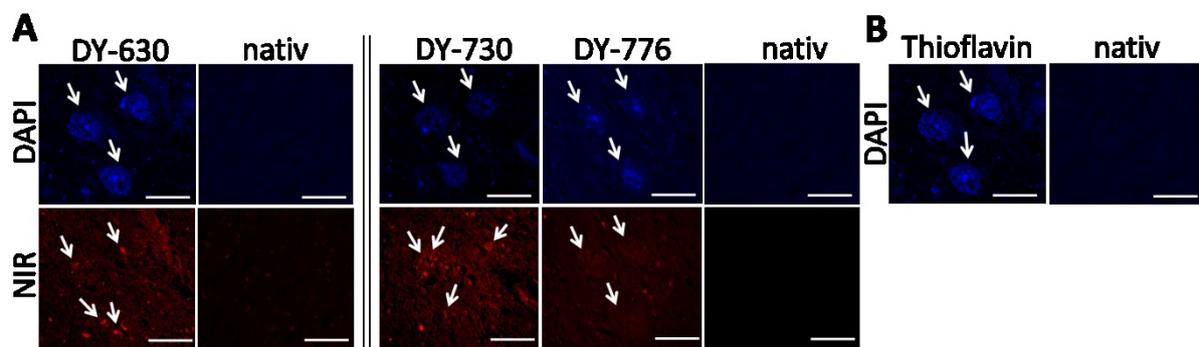


Abb. 8: Fluoreszenznachweis humaner A β -Plaques mit den Fluorochromen DY-630, DY-730 und DY-776. Extraneuronale A β -Plaques (siehe Pfeile) humaner AD-Hirnschnitte (Region: *Hippocampus, Cornu Ammonis*; Patient: männlich, Alter: 78 Jahre; Diagnose: AD; Klinikum Darmstadt) wurden *ex vivo* mit den asymmetrischen Hemicyaninen DY-630, DY-730, DY-776 (A) und der Referenzsubstanz Thioflavin T (B) gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung von DAPI- (Exc.: 357/44 nm; Em.: 447/60 nm) und NIR-Filtern Cy (Exc.: 628/40 nm; Em.: 692/40 nm) bzw. Cy7 (Exc.: 710/40 nm; Em.: 775/46 nm) ausgewertet. Ein nativer Schnitt wurde als ungefärbte Kontrolle zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. Messbalken: 100 μ m.

Ein ähnliches Bild ergab die Betrachtung humaner Neurofibrillenbündel (Abb. 9): Während mithilfe von DY-630, DY-730 und DY-776 der Nachweis der Tau-Fibrillen im DAPI-Filter gelang, konnte nur mit DY-630 und deutlich besser mit DY-730 im NIR-Bereich die

Anfärbung der Fibrillen bestätigt werden. Ein deutlicher Kontrast zum Umgebungsgewebe wie bei der Referenz Thioflavin T konnte jedoch nicht erreicht werden.

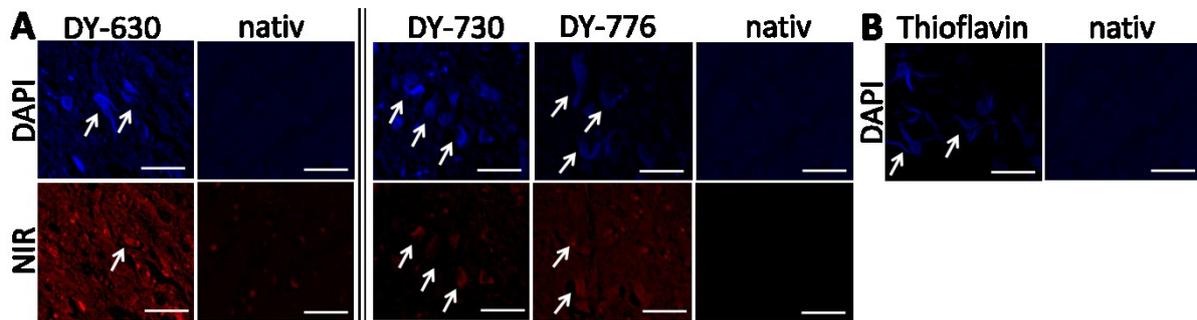


Abb. 9: Fluoreszenznachweis von humanen intrazellulären Neurofibrillenbündeln mit den NIR-Fluorochromen DY-630, DY-730 und DY-776. Tau-Fibrillen (siehe Pfeile) humaner AD-Hirnschnitte (Region: *Hippocampus, Cornu Ammonis*; Patient: männlich, Alter: 78 Jahre; Diagnose: AD; Klinikum Darmstadt) wurden *ex vivo* mit den asymmetrischen Hemicyaninen DY-630, DY-730, DY-776 (A) und der Referenzsubstanz Thioflavin T (B) angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung von DAPI- (Exc.: 357/44 nm; Em.: 447/60 nm) und den NIR-Filtern Cy (Exc.: 628/40 nm; Em.: 692/40 nm) bzw. Cy7 (Exc.: 710/40 nm; Em.: 775/46 nm) ausgewertet. Ein nativer Schnitt wurde als ungefärbte Kontrolle zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen. Messbalken: 50 µm.

5.3 Biokompatibilität der Fluorochrome gegenüber humanen Zellen

5.3.1 Einfluss der Fluorochrome auf die Dehydrogenaseaktivität humaner Zellen

Auf Endothelzellen, die nach einer intravenösen Applikation die erste Angriffsfläche der Fluorochrome darstellen, bewirkten die Fluorochrome BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511, DY-630, DY-730 und DY-776 in 100 nM Konzentration nach 24 h sowohl auf permanente (Abb. 10) als auch auf primäre Endothelzellen (Abb. 11) keine kritischen Veränderungen des Dehydrogenasemetabolismus und damit auch keine zytotoxischen Effekte. Eine Erhöhung der Fluorochromkonzentration um den Faktor 1.000 äußerte sich nur bei BSc4510 mit einer Senkung der HUVEC-Vitalität auf $55 \pm 8 \%$. Einen definitionsgemäß potentiell zytotoxischen Effekt (siehe 4.2.3.2) bewirkte 100 µM DY-776 auf HMEC-1 und HUVEC mit resultierenden Dehydrogenaseaktivitäten von $71 \pm 8 \%$ und $68 \pm 13 \%$ (Abb. 10 und 11).

Damit zeigte die Mehrheit der Fluorochrome eine deutlich bessere Verträglichkeit gegenüber Endothelzellen als die mitgeführten Referenzfluorochrome ICG (HMEC-1, 100 µM: $66 \pm 19 \%$) und MeX04 (HMEC-1, 20 µM: $60 \pm 9 \%$).

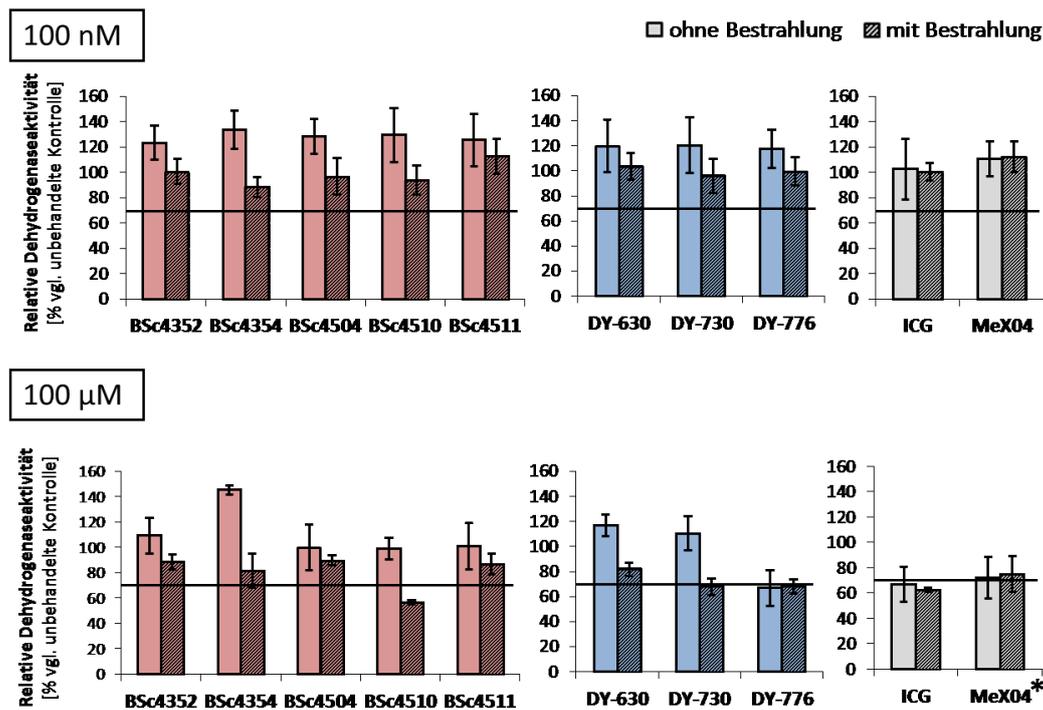


Abb. 10: Bis(arylvinyl)pyrazine, Bis(arylvinyl)pyrimidine und asymmetrische Hemicyanine induzierten mehrheitlich keine kritischen Effekte auf den Dehydrogenasemetabolismus vitaler permanenter Endothelzellen nach 24-stündiger Fluorochrominkubation in An- und Abwesenheit von Bestrahlung. Dargestellt ist der Vergleich der Dehydrogenaseaktivitäten (MW \pm STABW, n=3, normiert auf unbehandelte Kontrollen) von HMEC-1 nach 24-stündiger Inkubation mit 100 nM und 100 μ M der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) und den Referenzsubstanzen ICG und MeX04 (grau) (* 20 μ M statt 100 μ M) mit und ohne simultaner Lichtexposition von 2 J/cm². Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70 % (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

Die Bestrahlung der fluorochrominkubierten Zellen mit dem für die spätere volle Funktionsfähigkeit der Fluorochrome notwendigen Anregungslicht bewirkte auf permanente Endothelzellen zwar leichte Einbußen in der Dehydrogenaseaktivität, die sich aber nicht im kritischen Bereich bewegten. Einzig BSc4510 zeigte in 100 μ M Konzentration einen phototoxischen Effekt (56 \pm 2 %) (Abb. 10). Das Referenzfluorochrom MeX04 verursachte trotz der verwendeten niedrigen Konzentration von 20 μ M eine Senkung der relativen Dehydrogenaseaktivität auf 2 \pm 4 % und damit einen sehr starken phototoxischen Effekt auf HUVEC (Abb. 11).

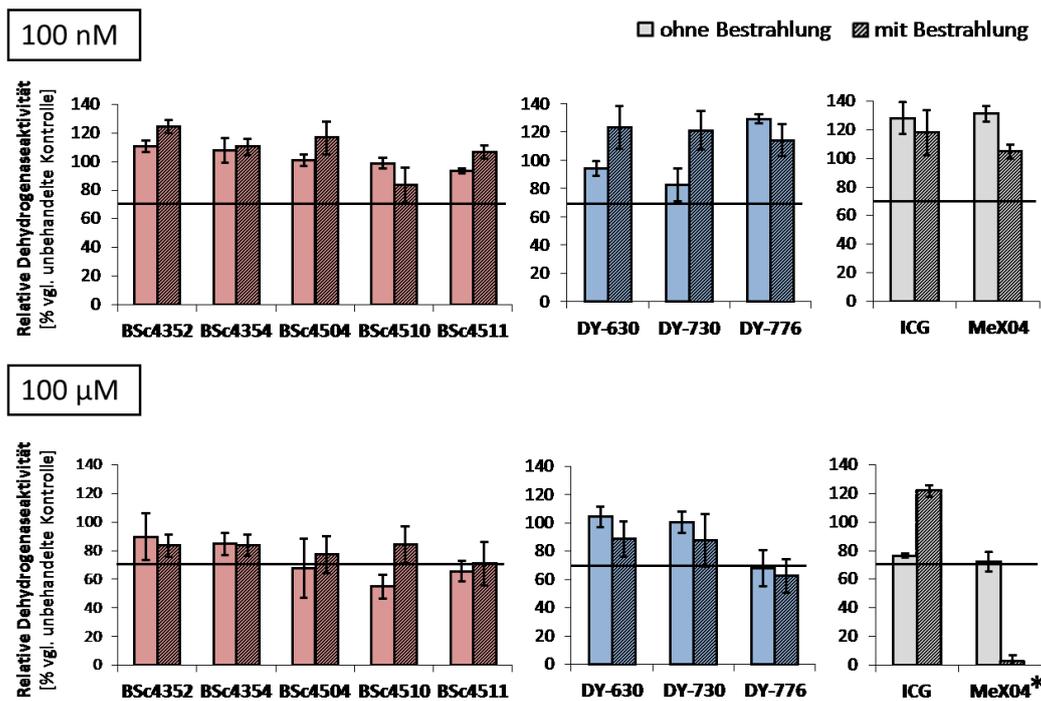
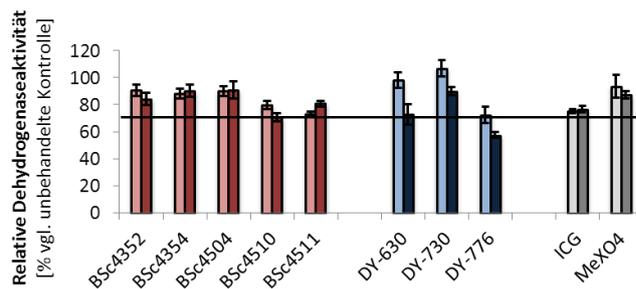


Abb. 11: Die Bestrahlung von primären Endothelzellen bewirkte keine phototoxischen Effekte durch die VIS- und NIR-Fluorochrome. HUVEC wurden mit 100 nM bzw. 100 µM der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) und den Kontrollsubstanzen ICG und MeX04 (grau) (* 20 µM statt 100 µM) über 24 h inkubiert, ein weiterer Ansatz wurde zusätzlich mit 2 J/cm² bestrahlt. Dargestellt sind die auf eine unbehandelte Kontrolle normierten Dehydrogenaseaktivitäten (MW ± STAB, n=3). Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70 % (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 und 72 h verstärkte die definitionsgemäß potentiellen zytotoxischen Effekte von DY-776 auf HMEC-1 (Abb. 12). Im Vergleich zu permanenten Endothelzellen zeigten die primären HUVEC eine deutliche Sensibilität gegenüber der Mehrzahl der VIS- und NIR-Fluorochrome nach Verlängerung der Fluorochrominkubation auf 48 bzw. 72 h. Einzig die Bis(arylvinyl)pyrazine BSc4352 und BSc4354 lösten keine zytotoxischen Effekte auf die primären Endothelzellen aus.

Das Fluorochrom DY-730 löste nach 48 h nur einen potentiell zytotoxischen Effekt aus (77 ± 17 % resultierende relative Dehydrogenaseaktivität) und wurde damit innerhalb der NIR-Fluorochrome am besten von den HUVEC toleriert. Die Referenzfluorochrome zeigten zu beiden Zeitpunkten zytotoxische Effekte auf die primären Endothelzellen.

Permanente Endothelzellen



Primäre Endothelzellen

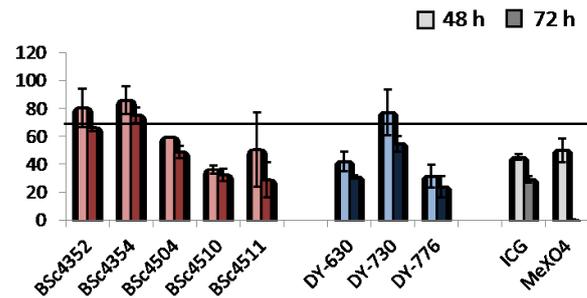


Abb. 12: Primäre Endothelzellen erfuhren durch eine 48- und 72-stündige Fluorochrominkubation im Vergleich zu permanenten Endothelzellen stärkere zytotoxische Effekte auf den Dehydrogenasemetabolismus. HMEC-1 und HUVEC wurden mit 100 μM der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) und den Referenzfluorochromen ICG und MeX04 (grau) (MeX04: 48 h- 10 μM , 72 h: 8,5 μM) für 48 und 72 h behandelt. Dargestellt sind MW \pm STABW der auf die unbehandelte Kontrolle normierten Dehydrogenaseaktivitäten, n=3. Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70 % (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

Eine 24-stündige Inkubation der Fluorochrome mit nasalen Epithelzellen, die bei intranasaler Applikation den ersten Kontakt der Fluorochrome mit dem Organismus darstellen, beeinflusste den Dehydrogenasemetabolismus und damit die Vitalität nicht. Nach 48 h und auch nach 72 h äußerte sich die Fluorochrominkubation mit BSc4352 (51 \pm 8 % und 20 \pm 8%) und DY-630 (51 \pm 3 % und 36 \pm 10 %) sowie DY-730 (59 \pm 6 % und 38 \pm 7 %) jedoch in einer zum Teil drastischen Senkung der Zellvitalität. Die Referenzen ICG und MeX04 zeigten dagegen allerdings noch stärkere zytotoxische Effekte auf nasale Epithelien (Abb. 13).

Keines der getesteten VIS- und NIR-Fluorochrome bewirkte eine Senkung der Dehydrogenaseaktivität vitaler Leberzellen unter 70 % (vgl. Ausgangswert). Auf primäre Nierenzellen zeigten sich jedoch zytotoxische Effekte durch BSc4510 (24 h: 65 \pm 4 %; 48 h: 47 \pm 3 %; 72 h: 45 \pm 1 %) und DY-730 (72 h: 55 \pm 2 %) (Abb. 14).

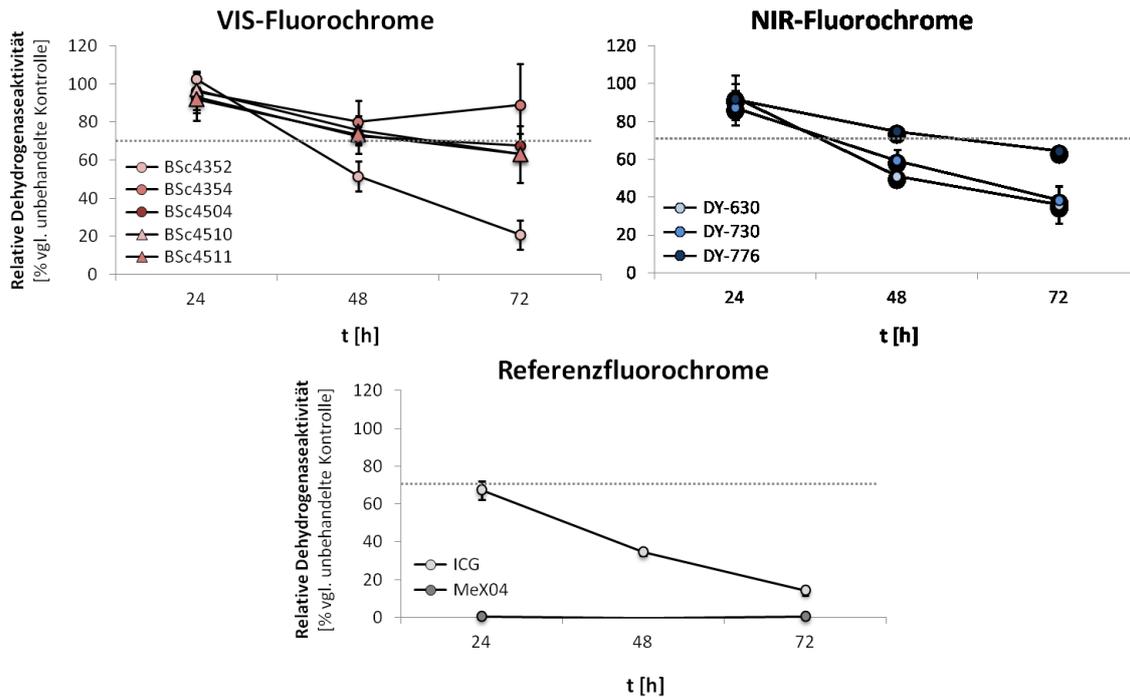


Abb. 13: Referenzfluorochrome sind zytotoxischer auf nasale Epithelzellen im Vergleich zu den neuartigen fluorochromen Sonden. Nasenepithelzellen wurden für 24, 48 und 72 h mit den Fluorochromen (100 μ M) aus dem VIS (rot)- und NIR-Bereich (blau) und den Referenzsubstanzen ICG (100 μ M) und MeX04 (24 h: 20 μ M, 48 h: 10 μ M, 72 h: 8,5 μ M) (grau) inkubiert und die Dehydrogenaseaktivität der Zellen vermessen. Dargestellt sind MW \pm STABW der auf die unbehandelte Kontrolle normierten Dehydrogenaseaktivitäten, n=3. Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70 % (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

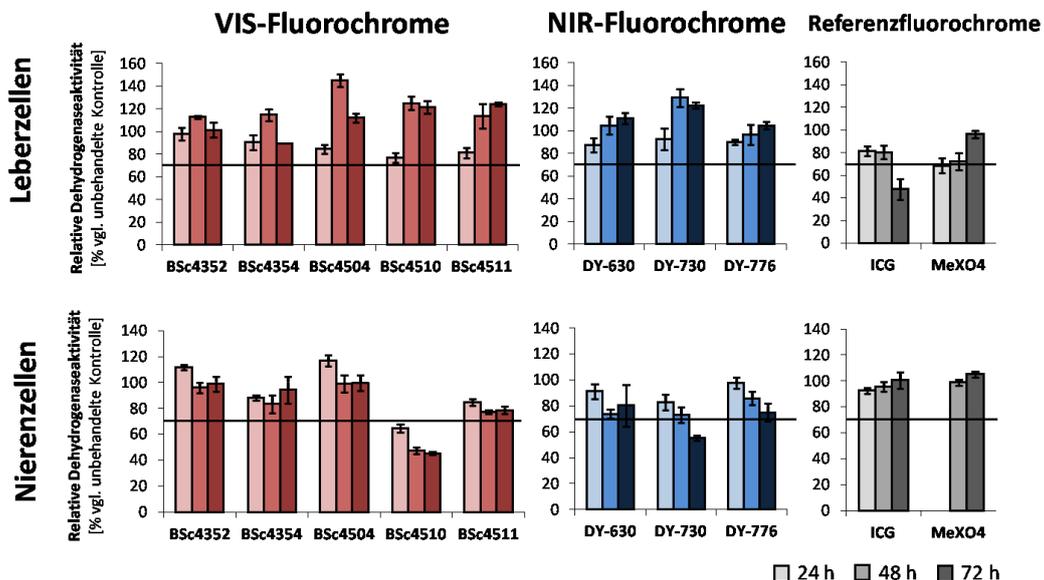


Abb. 14: Einfluss der VIS- und NIR-Fluorochrome auf den Dehydrogenasemetabolismus vitaler Zellen des Entgiftungsapparates (primäre Leberzellen und Nierenepithelien). Die Dehydrogenaseaktivität (im Vgl. zu unbehandeltem Ausgangswert, MW \pm STABW, n=3) vitaler primärer Leberzellen (HHpC) und Nierenepithelien (HREpC) wurde nach 24-, 48-, und 72-stündiger Inkubation mit 100 μ M der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) und den Referenzen ICG und MeX04 (grau) (MeX04: 24 h: 20 μ M, 48 h: 10 μ M, 72 h: 8,5 μ M) bestimmt. Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70 % (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

Perizyten, deren Unversehrtheit aufgrund ihrer Beteiligung am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke für diese Arbeit besonders relevant ist, erfuhren in keinerlei Hinsicht Beeinträchtigungen in ihrer Dehydrogenaseaktivität ($\leq 70\%$ vgl. Ausgangswert) durch die Inkubation mit den Fluorochromen- unabhängig von der Art des jeweiligen Fluorochroms, der eingesetzten Konzentration, Inkubationsdauer und der Anwesenheit von Licht (Abb. 15).

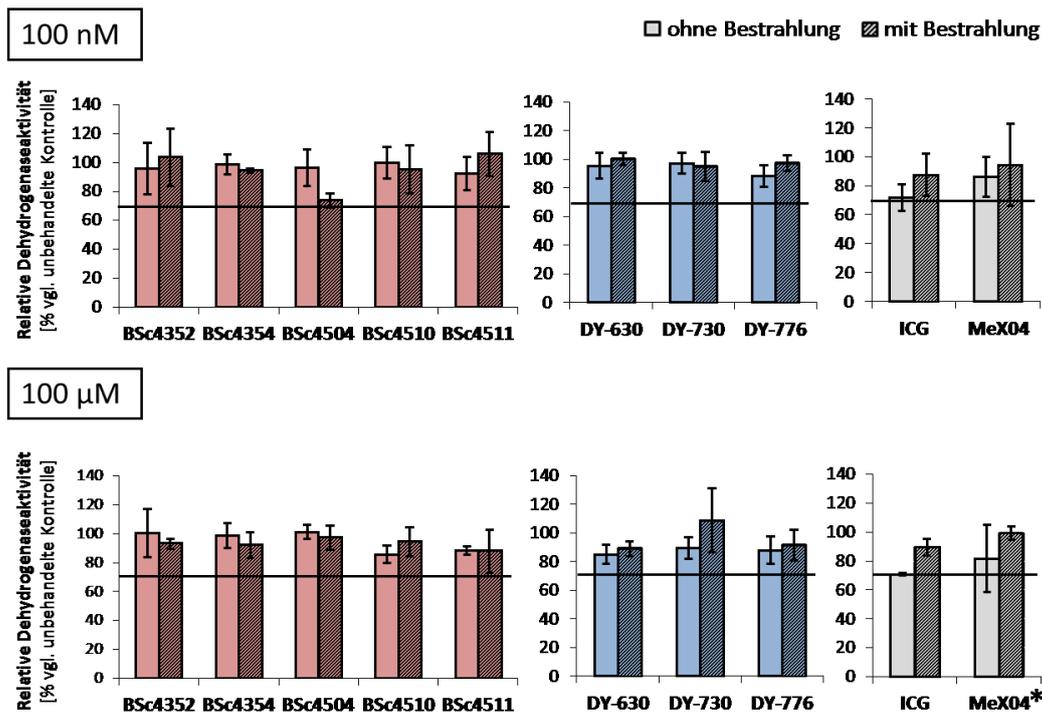


Abb. 15: Keine Beeinträchtigung des Dehydrogenasemetabolismus primärer Perizyten durch die alleinige Inkubation mit Fluorochromen und simultane Bestrahlung. Dargestellt sind die Dehydrogenaseaktivitäten (vgl. unbehandelte Kontrolle; MW \pm STABW, n=3.) von Perizyten (hPC-PL) in An- und Abwesenheit von Lichtstrahlung (2 J/cm^2) nach 24-stündiger Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) und den Referenzen ICG und MeX04 (grau) (MeX04: 24 h: $20 \mu\text{M}$, 48 h: $10 \mu\text{M}$, 72 h: $8,5 \mu\text{M}$). Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70% (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

Ähnlich wie die Perizyten zeigten Zellen des Binde- und Stützgewebes wie Fibroblasten und neuronale Gliazellen eine gute Robustheit gegenüber den Fluorochromen. Mit der einzigen Ausnahme bewirkte DY-730 auf humane Fibroblasten nach 48 h eine Senkung der relativen Dehydrogenaseaktivität auf $67 \pm 2\%$ und nach 72 h auf $43 \pm 3\%$. ICG und MeX04 lösten zu allen Zeitpunkten auf Fibroblasten zytotoxische Effekte aus (Abb. 16).

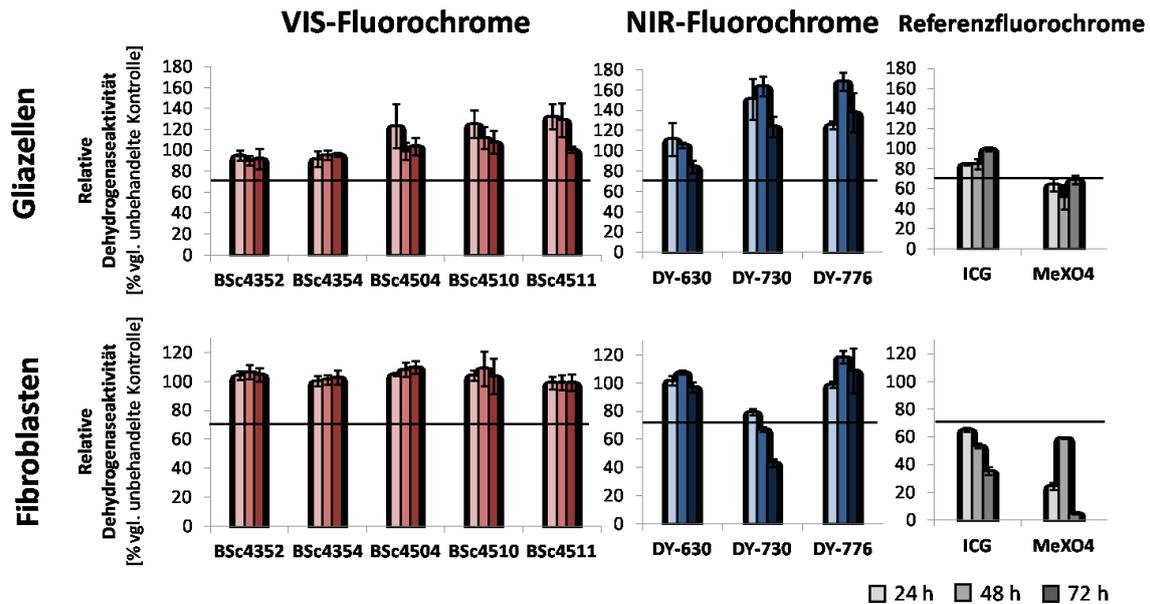


Abb. 16: Einfluss von 100 μM Fluorochromlösungen auf Zellen des Binde- und Stützgewebes (Gliazellen und Fibroblasten). Gliazellen (U-188MG) und Fibroblasten (NHDF) wurden mit 100 μM der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) und den Referenzen ICG und MeX04 (MeX04: 24 h: 20 μM , 48 h: 10 μM , 72 h: 8,5 μM) über 24, 48 und 72 h behandelt und die Dehydrogenaseaktivitäten im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle ermittelt (MW \pm STABW, n=3). Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70 % (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

Die hinsichtlich ihrer Ladung C18-modifizierten DY-730-Fluorochrome DY-Mod 1 und DY-Mod 2 (siehe 4.1.4) induzierten stärkere zytotoxische Effekte auf permanente Leber- und Endothelzellen als ihr negativ geladenes Pendant DY-730 (siehe Abb. 10, Abb. 12). Vor allem DY-Mod 1 induzierte starke zytotoxische Effekte auf permanente Endothelien (Abb. 17).

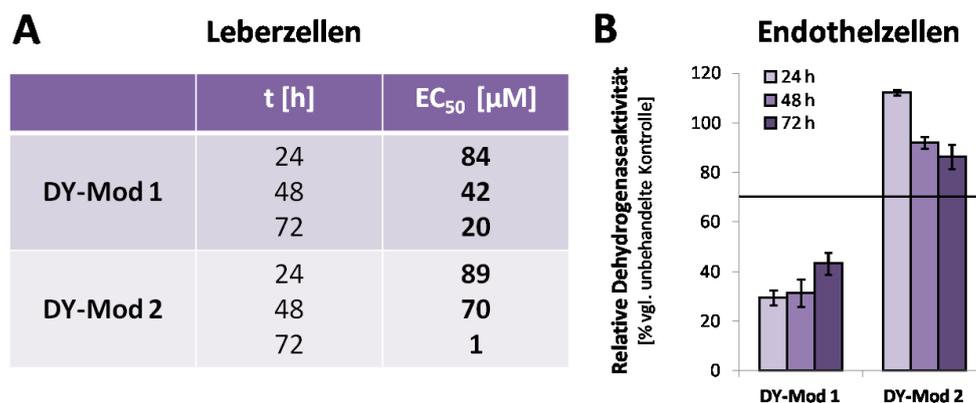


Abb. 17: Die um eine C18-Kette erweiterten Modifikationen (DY-Mod 1, DY-Mod 2) des NIR-Fluorochroms DY-730 beeinträchtigten den Dehydrogenasemetabolismus permanenter Leber- und Endothelzellen. Die modifizierten DY-730-Moleküle DY-Mod 1 und DY-Mod 2 (siehe 4.1.4) wurden in den an Leberzellen (HepG2) ermittelten EC₅₀ (A) für 24, 48 und 72 h auf permanenten Endothelzellen HMEC-1 (B) gebracht und die relative Dehydrogenaseaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (MW \pm STABW, n=3). Relative Dehydrogenaseaktivitäten unter 70 % (schwarze Linie) kennzeichnen zytotoxische Effekte (lt. DIN ISO 10993-5:2009).

5.3.2 Intrazelluläre Akkumulation der Fluorochrome

Nach einer 48-stündigen Inkubation konnten sowohl die VIS- als auch die NIR- Fluorochrome fluoreszenzmikroskopisch intrazellulär nachgewiesen werden (Abb. 19). Eine Kolokalisation mit dem Zellkern zeigte sich bei allen Fluorochromen (festgestellt mittels Z-Stacking, konfokale LSM). Während die Mehrheit der Fluorochrome eine geringe (punktuelle Fluorochromdetektion: BSc4354, DY-630, DY-776) bis moderate (deutlich nachweisbare Fluorochromfluoreszenz: BSc4352, BSc4504, BSc4511, DY-730) Akkumulation in der Endothelzelle zeigten, dehnte sich die Anreicherung von BSc4510 auf das gesamte Zytosol aus (Abb. 18).

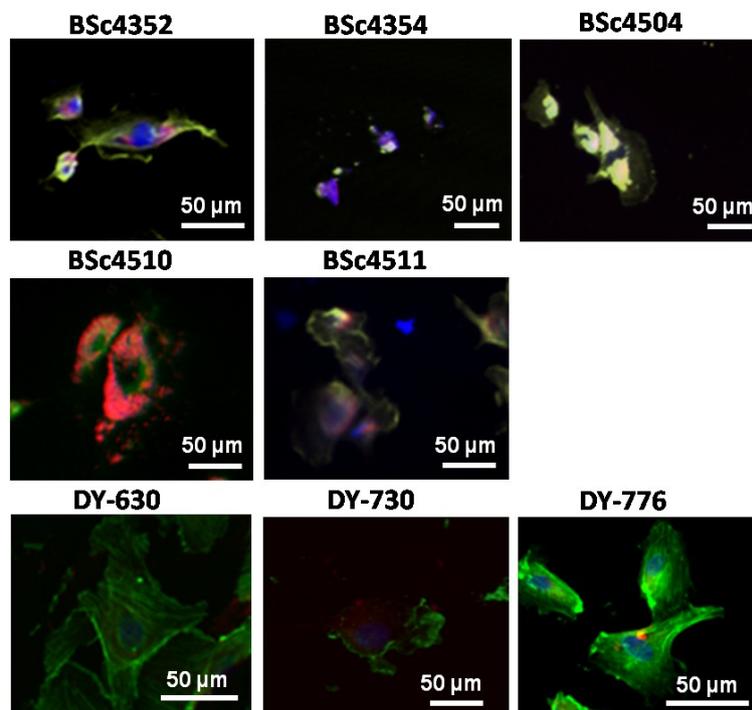


Abb. 18: Kolokalisation der VIS- und NIR-Fluorochrome mit dem Zellkern primärer Endothelzellen BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510, BSc4511 sowie DY-630, DY-730 und DY-776 (100 µM) wurden 48 h mit HUVEC inkubiert und ihre intrazelluläre Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Zellkern: blau (Hoechst), Zytoskelett: grün (Alexa Fluor Phalloidin), Fluorochrom: rot. Messbalken: 50 µm.

5.3.3 Einfluss der Fluorochrome auf die intrazelluläre ROS-Produktion

Nach der Inkubation mit den Fluorochromen BSc4504, BSc4511, DY-630, BSc4510 und DY-776 - aufsteigend geordnet nach der von ihnen verursachten Senkung der relativen Dehydrogenaseaktivität der primären Endothelzelllinie HUVEC nach 48 h - konnten erhöhte

intrazelluläre ROS-Spiegel (vgl. unbehandelte Kontrolle) gemessen werden. Die Fluorochrome induzierten relative ROS-Gehalte von $1,14 \pm 0,20$ (BSc4504), $1,97 \pm 0,10$ (BSc4511), $2,00 \pm 2,23$ (DY-630), $1,62 \pm 0,47$ (BSc4510) und $2,33 \pm 0,88$ (DY-776) (Abb. 19).

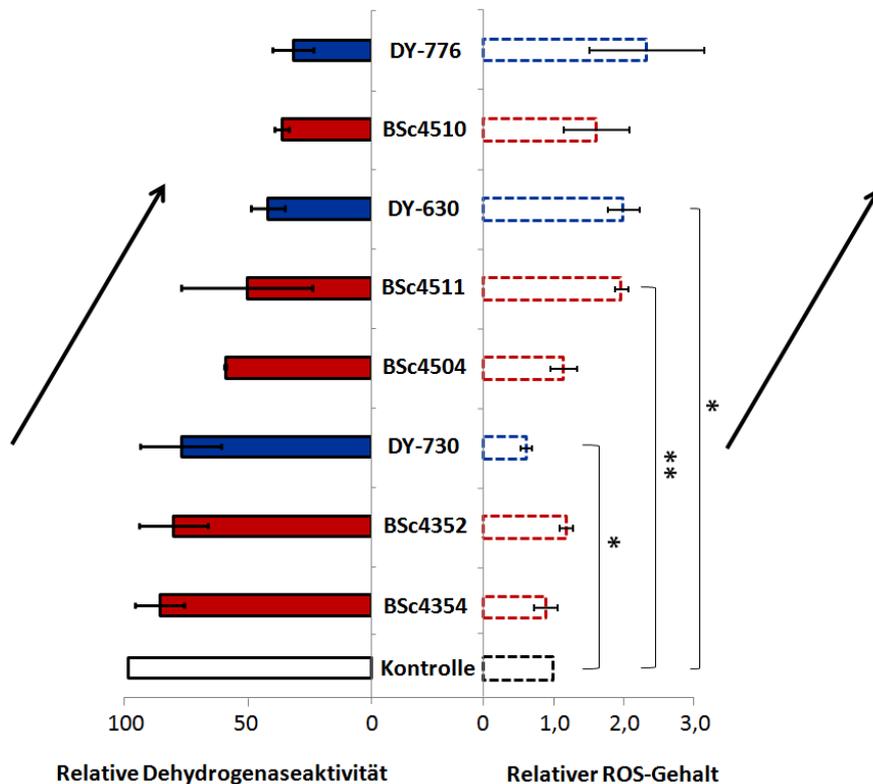


Abb. 19: Die zytotoxischen Effekte der Fluorochrome sind bei primären Endothelzellen ROS-assoziiert. HUVEC wurden mit $100 \mu\text{M}$ des jeweiligen VIS- (rot) oder NIR-Fluorochroms (blau) für 48 h inkubiert und die ermittelten intrazellulären ROS-Gehalte (normiert auf eine unbehandelte Kontrolle) mit den aufsteigend dargestellten Dehydrogenaseaktivitäten in den Vergleich gesetzt. Eine Abnahme der relativen Dehydrogenaseaktivität korreliert dabei mit der Zunahme des relativen intrazellulären ROS-Gehalts (Pfeile). Die Signifikanzen der normal verteilten Daten (MW \pm STABW, $n=3$) wurden mithilfe eines t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$: signifikant; ** $p < 0,01$: hoch signifikant).

5.3.4 Einfluss ausgewählter Fluorochrome auf die Genexpression stressrelevanter Enzyme

Die Reportergenexperimente zur Untersuchung der Induzierbarkeit der Expression der Glutathion-S-Transferase T2 (GSTT2) zeigten, dass unabhängig von der auf HUVEC nachgewiesenen Zytotoxizität sowohl BSc4352, DY-730 und BSc4510 eine erhöhte GSTT2-Promotoraktivität induzieren konnten. Dabei wurden Steigerungen der GSTT2-Promotoraktivität im Vgl. zur unbehandelten Kontrolle auf 236 ± 103 % (BSc4352), 288 ± 151 % (DY-730) und 242 ± 33 % (BSc4510) erreicht, wobei der Effekt nur bei BSc4510 als signifikant einzustufen war ($p < 0,05$) (Abb. 20).

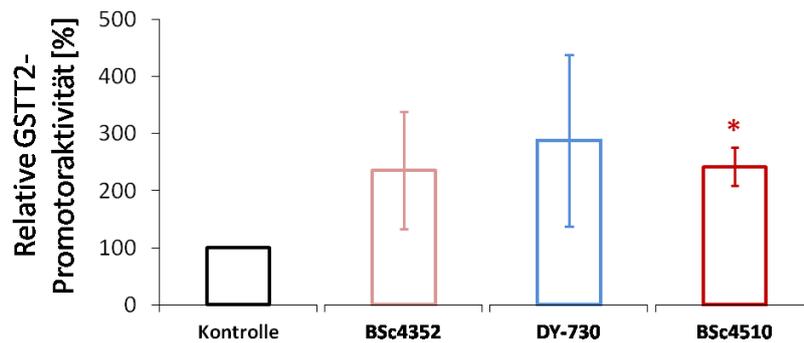


Abb. 20: Die VIS-Fluorochrome BSc4352 und BSc4510 sowie das NIR-Fluorochrom DY-730 steigerten die GSTT2-Promotoraktivität. Mit einem GSTT2-Promotorkonstrukt transfizierte HUVECs wurden mit 100 μ M BSc4352, BSc4510 und DY-730 für 48 h inkubiert und die GSTT2-Promotoraktivitäten durch Lumineszenzmessung unter Zuhilfenahme eines Luciferasegenreportervektors realisiert. Die resultierenden Lumineszenzwerte sind auf eine mitgeführte unbehandelte, aber ebenso transfizierte Kontrolle normiert und werden prozentual als relative Reporteraktivität ($MW \pm STABW$, $n=3$) angegeben. Die Signifikanzen der normal verteilten Daten wurden mithilfe des t-Tests bestimmt (* $p < 0,05$: signifikant).

Die quantitative Erfassung der Modulation der Genexpression stressrelevanter Signalmoleküle auf mRNA-Ebene durch die Inkubation mit den Fluorochromen BSc4352, DY-730 und BSc4510 zeigte durchaus Unterschiede in der Genexpression von an der Stressreaktion beteiligter Enzyme (Abb. 21, Tab. 10). Die Inkubation mit den VIS-Fluorochromen BSc4352 und BSc4510 bewirkte eine Steigerung der Expression von deutlich mehr an oxidativem Stress beteiligten Signalmolekülen und in einem stärkerem Maß (über Faktor 100) als es nach der Inkubation mit DY-730 der Fall war. Auffallend war bspw. die verminderte Expression der NADPH-Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQO1) durch das auf HUVEC zytotoxisch wirkende Fluorochrom BSc4510, während das auf HUVEC nur potentiell zytotoxische Fluorochrom DY-730 eine Expressionssteigerung um den Faktor 6 und das nicht zytotoxische Fluorochrom BSc4352 eine Überexpression dieses antioxidativ wirkenden Enzyms um den Faktor 3.641 induzierten. Einen weiteren Unterschied in der Modulation der Genexpression zeigte die Herunterregulation der Genexpression von FTH1, einem Ferritin-assoziierten Gen, durch BSc4352, während die deutlich zytotoxischeren Fluorochrome DY-730 und BSc4510 eine Genexpressionssteigerung von FTH1 um den Faktor 15 bzw. 8 bewirkten.

Ein Großteil von Reparaturmechanismen, die eine genomische Stabilität gewährleisten sollen, wurde besonders durch die Behandlung der Endothelien mit den VIS-Fluorochromen BSc4352 und BSc4510 induziert.

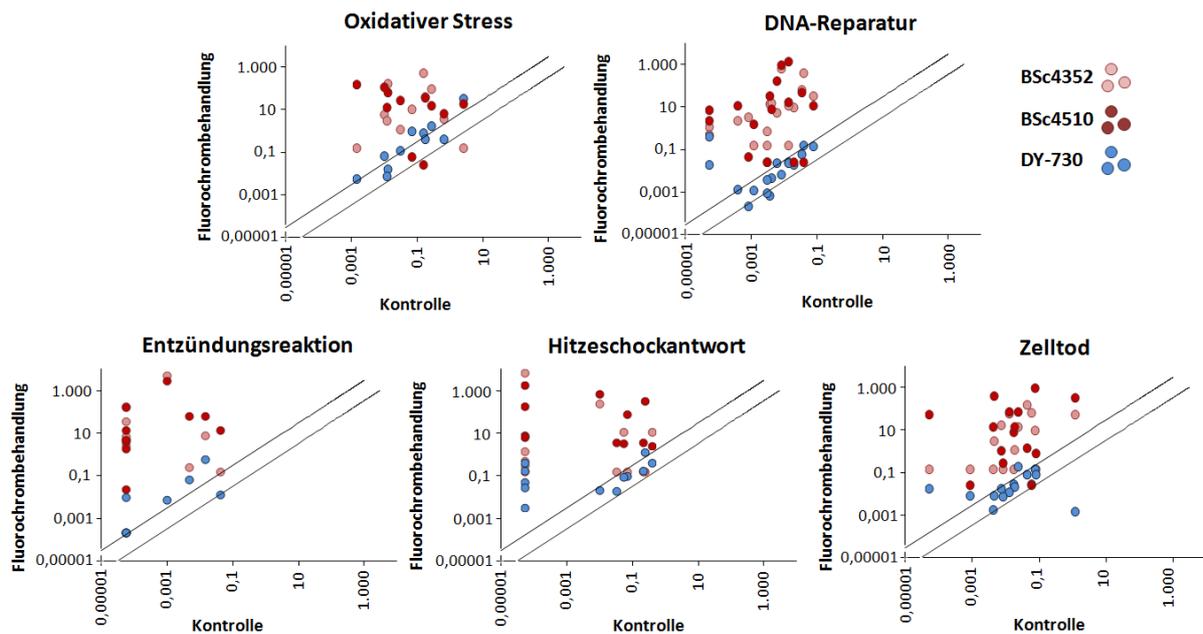


Abb. 21: Expression stressrelevanter Signalmoleküle nach 48-stündiger Inkubation mit den Fluorochromen BSc4352, BSc4510 und DY-730. HUVEC wurden über 48 h mit den Fluorochromen BSc4352 (hellrot), BSc4510 (rot) und DY-730 (blau) (100 μ M) behandelt und mittels qRT-PCR die Niveaus der Expression der betrachteten Gene (dargestellt als $2^{-\Delta Ct}$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Die Gene sind in den Scatter Plots hinsichtlich ihrer Funktionalität geordnet, jeder Datenpunkt entspricht dabei einem Gen. Relevant sind dabei Veränderungen der Genexpression (im Vgl. zum Grundniveau der unbehandelten Kontrolle) mit einem Fold Change über 3 und unter 0,5 (Datenpunkte außerhalb des Linienbereiches). Die Quantifizierungen der Veränderungen in der Genexpression sind in Tab. 10 zusammengefasst. Dargestellt sind repräsentative Daten einer von 3 biologischen Wiederholungen unter Zuhilfenahme des RT²Profiler PCR Array Human Stress & Toxicity PathwayFinders.

Eine besonders starke Überexpression zahlreicher entzündungsrelevanter Gene erfolgte BSc4510-induziert. Hohe Expressionssteigerungen erfuhren dabei die Interleukine IL-1A, IL-6, IL-8 (Fold Change: 3.134.926, 15.393, 4.705), der Tumornekrosefaktor (Fold Change: 101.421), das C-reaktive Protein (Fold Change; 83.530) und der B-Zell-regulierenden CD40-Ligand (Fold Change: 3.313.673).

Die Expression von Hitzeschockproteinen wie HSP90B1, HSPA4 oder HSPA5 wurde durch BSc4352 und BSc4510 in Richtung einer Überexpression modifiziert, wohingegen diese Art von zur Stressantwort zugehörigen Signalmolekülen durch DY-730 unbeeinflusst blieb. Betrachtet man die Expression von Signalmolekülen, die beim Zelltod eine Rolle spielen, so fällt die große Anzahl überexprimierter Gene durch die VIS-Fluorochrome BSc4352 und BSc4510 auf, während der Großteil der getesteten Zelltod-relevanten Gene durch die DY-730-Behandlung unbeeinflusst blieben (Abb. 21, Tab. 10).

Tab. 10: Kategorisierung der Genexpressionssteigerungen stressrelevanter Gene durch die Behandlung mit den Fluorochromen BSc4352, DY-730 und BSc4510. In der Tabelle sind die in Abb. 21 dargestellten Genveränderungen quantitativ aufgelistet. Die ausgeschriebenen Genbezeichnungen sind im Abkürzungsverzeichnis nachzulesen.

	Fold Change < 0	Fold Change > 3	Fold Change > 100	Fold Change > 1.000
OXIDATIVER STRESS				
BSc4352	FTH1	GSTP1, GCLM	GSR, TXNRD1, TXN, PRDX1, SQSTM1, HMOX1	NQO1, GCLC
DY-730	-	GCLM, GSR, NQO1, SQSTM1, HMOX1, FTH1, TXNRD1	-	-
BSc4510	NQO1	FTH, GSTP1, SQSTM1	TXN, GCLM	PRDX1, GCLC, HMOX1, GSR
DNA-REPARATUR				
BSc4352	-	HUS1, RAD51	ATM, RAD9A, TP53, NBN, RAD17, XPC	CDKN1A, CHEK2, CHEK1, ATR, GADD45G, DDIT3, GADD45A, DDB2, MRE11A
DY-730	ATR, CHEK1, RAD51	XPC, GADD45A, GADD45G	DDB2	DDIT3
BSc4510	-	RAD51, RAD9A, ATR	TP53	CDKN1A, ATM, CHEK2, XPC, CHEK1, GADD45G, DDB2, HUS1, MRE11A, DDIT3
ENTZÜNDUNGSREAKTION				
BSc4352	-	TLR4, IL-6	IL-8	IFNG, CRP, CCL2, TNF, IL-1B, CD40-LG, IL-1A
DY-730	-	CD40LG, CRP, IFNG, IL-1B, TNF, IL-6, IL-8	CCL2	-
BSc4510	-	-	TLR4, IL-1B	IL-8, CCL2, IL-6, CRP, TNF, IFNG, IL-1A, CD40LG
HITZESCHOCKANTWORT				
BSc4352	-	ATF6B, HSP90B1	HSPA4	CALR, BID, DDIT3, DNAJC3, HSPA5, BBC3
DY-730	-	ATF4, BBC3	DNAJC3, BID	CALR, DDIT3
BSc4510	-	HSP90B1, HSP90AA1, HSPA4	ATF6B	ATF6, ATF4, HSPA5, CALR, DDIT3, BBC3, BID, DNAJC3
ZELLTOD				
BSc4352	-	Apoptose: CASP1, FAS Autophagozytose: ATG12, ATG5 Nekrose: RIPK1	Apoptose: MCL1 Autophagozytose: ATG7, ULK1 Nekrose: PVR	Autophagozytose: BECN1 Nekrose: PARP1, TNFRSF10A, TNFRSF1A, GRB2
DY-730	Apoptose: FAS	Autophagozytose: ATG7 Nekrose: PVR	Autophagozytose: BECN1	-
BSc4510	-	Apoptose: TNFRSF10B, TNFRSF1A Autophagozytose: ATG7 Nekrose: RIPK1	Apoptose: TNFRSF10A, FAS Autophagozytose: ATG12, ATG5	Apoptose: CASP1, MCL1, Autophagozytose: ULK1, BECN1 Nekrose: PVR, GRB2

Fas, ein Signalmolekül des extrinsischen Apoptoseweges (Micheau et al. 2013), wurde durch die Inkubation mit DY-730 in HUVEC herunterreguliert, während die Behandlung der Zellen mit BSc4352 bzw. 4510 eine Expressionssteigerung von Fas um den Faktor 49 bzw. 294 induzierte. Die Expression des Enzyms Caspase 1, welches über die Aktivierung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β als Mediator der entzündungsreaktiongekoppelten Apoptose agiert (Denes et al. 2012), blieb von DY-730 unbeeinflusst, doch BSc4352 erreichte eine Expressionssteigerung um den Faktor 39, BSc4510 um 3.641.

5.4 Hirngängigkeit der fluorochromen Sonden

5.4.1 Einschätzung der Hirngängigkeit der fluorochromen Sonden über die Bestimmung des LogP-Wertes in Kombination mit weiteren polaritätsbestimmenden Parametern sowie dem Molekulargewicht und der Ladung

Die ladungsfreien VIS-Fluorochrome BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510 und BSc4511 zeigten im Durchschnitt Molekulargewichte unter 500 g/mol und TPSA-Werte, die sich zwischen 30 und 50 Å² bewegten und damit nur einem Drittel der polaren Moleküloberfläche der asymmetrischen Hemicyanine entsprechen (Tab. 11). Die Berechnung der physikochemischen Eigenschaften der einfach negativ geladenen NIR-Fluorochrome DY-630 und DY-730 ergab dagegen Molekulargewichte von über 600 g/mol sowie TPSA-Werte von etwa 115 Å². Die ermittelten LogP-Werte der VIS- als auch NIR-Fluorochrome bewegten sich auf einem ähnlichen Niveau im lipophilen Bereich.

Tab. 11: Theoretisch ermittelte Parameter der Fluorochrome im Hinblick auf ihre Hirngängigkeit. TPSA- topological polar surface area in Å²; TPSA und LogP fragmentbasiert via <http://www.molinspiration.com> ermittelt. MW- Molekulargewicht in g/mol; * Ladung bei pH 7.

	TPSA	LogP	MW	Ladung*
BSc4352	32,26	5,67	371	± 0
BSc4354	44,25	5,58	344	± 0
BSc4504	50,73	5,36	455	± 0
BSc4510	32,26	7,49	451	± 0
BSc4511	32,26	6,48	423	± 0
DY-630	114,97	5,68	634	-1
DY-730	114,97	6,20	660	-1
ICG	120,64	2,13	752	-1

Auch nach der experimentellen Bestimmung der Verteilung der Fluorochrome in einem Octanol-Wasser-System konnten positive LogP-Werte ermittelt werden. Das NIR-Fluorochrom DY-730 wies mit einem LogP-Wert von $5,24 \pm 0,03$ die höchste Lipophilie auf (Abb. 22).

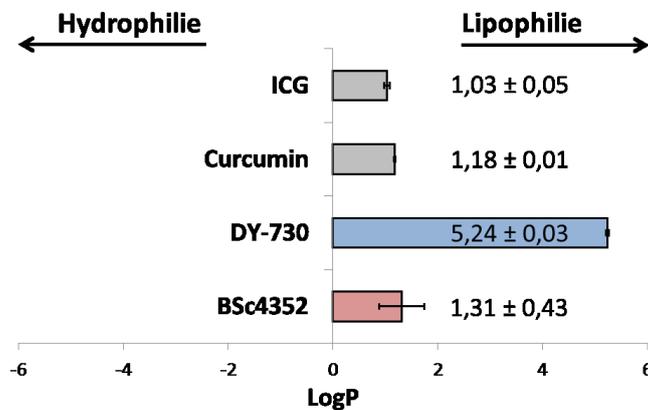


Abb. 22: Experimentell bestimmte LogP-Werte der Fluorochromfavoriten BSc4352, DY-730 und der Referenzfluorochrome Curcumin und ICG. Die LogP-Werte wurden auf der Basis der Verteilung des jeweiligen Fluorochroms in einem Octanol-Wasser-Phasengemisch ermittelt. Dargestellt sind MW \pm STABW, n=3.

5.4.2 *In vitro*-Permeation der Fluorochrome durch einen Zellmonolayer

Im *in vitro*-Blut-Hirn-Schranke-Modell zeigten alle Fluorochrome, mit der Ausnahme von BSc4510, eine Permeation durch den Zellmonolayer. Die mitgeführten Kontrollen wie ICG und die höhermolekularen FITC-Dextran-Moleküle (4 und 70 kDa) zeigten zum gewählten Messzeitpunkt keinen Durchtritt durch den Monolayer (Abb. 23).

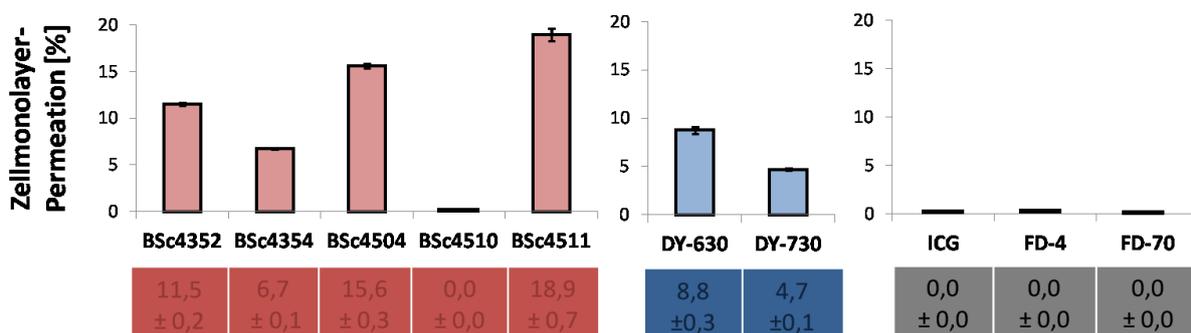


Abb. 23: Permeation der VIS- und NIR-Fluorochrome durch einen Endothelzellmonolayer. Die relative Permeation der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) ($50 \mu\text{M}$) durch einen HMEC-1-Monolayer wurde 30 min nach der Inkubation als der prozentuale Anteil der Fluorochromausgangslösung spektroskopisch bestimmt, der die Zellschicht passieren konnte. Die ausbleibende Diffusion der als nicht hirngängig bekannten Referenzfluorochrome ICG und FD (FITC-Dextran-Moleküle von 4 kDa (FD-4) und 70 kDa Größe (FD-70)) zeigten die Dichtigkeit des Monolayers an. Die Zahlenwerte unter der Grafik stellen die Prozentwerte der Zellmonolayerpermeation (MW \pm STABW, n=3) dar.

5.4.3 Anreicherung der Fluorochromfavoriten in Auge und Gehirn nach intravenöser und intranasaler Applikation

Die Fluorochrome BSc4352 und DY-730, welche beide *in vivo* fluoreszenzbildgebend im Kopfbereich kurz nach der i.v. Applikation dargestellt werden konnten, zeigten Unterschiede in der Anflutung im Kopfbereich (Abb. 24): die durchschnittlichen Fluoreszenzsignale von BSc4352 im Kopfbereich erreichten erst 15 min p.i. ihr Maximum und zeigten damit einen ähnlichen Verlauf wie das hirngängige Referenzfluorochrom Curcumin. Mäusen, die eine osmotische Öffnung der Blut-Hirn-Schranke mit Mannitol erfuhren und gleichzeitig BSc4352 injiziert bekamen (siehe 4.2.4.4), zeigten ebenso den gleichen zeitlichen Verlauf und die gleiche Signalstärke wie Mäuse, die keine osmotische Blut-Hirn-Schranke-Eröffnung erhielten. Das NIR-Fluorochrom DY-730 erlangte genauso wie das nicht hirngängige ICG bereits 0 min p.i. seine stärksten Fluoreszenzsignale im Kopfbereich, gefolgt von einer Auswaschung aus dem Blut im Verlauf der 4 h.

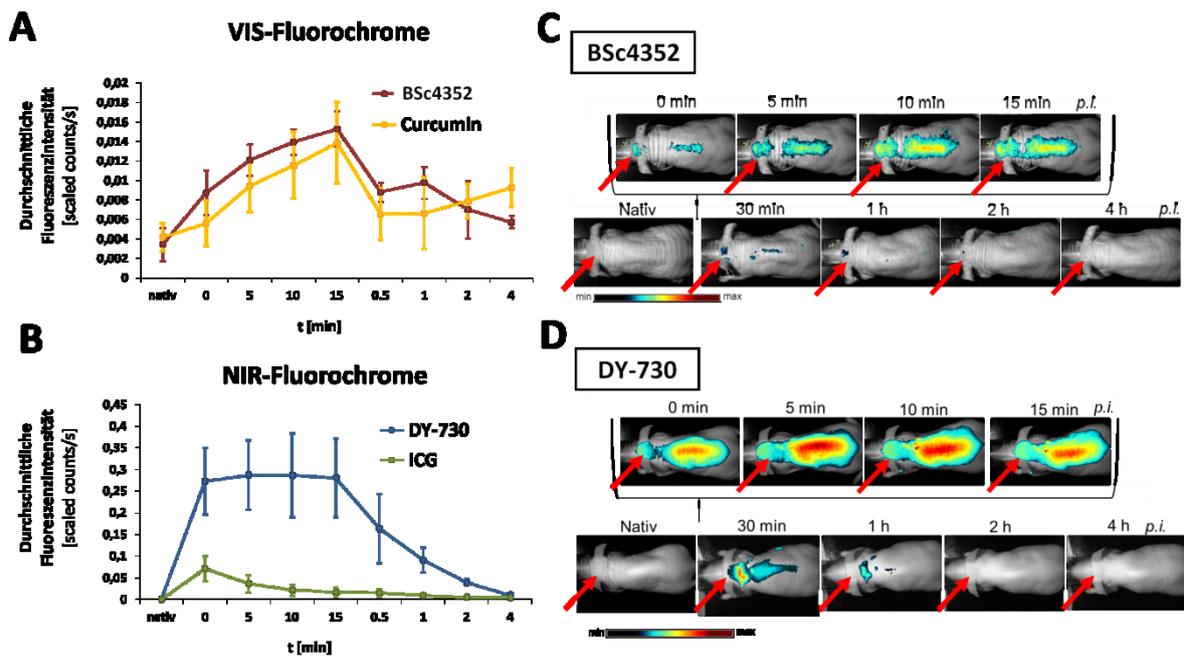


Abb. 24: Anreicherung der Fluorochromfavoriten BSc4352 und DY-730 sowie der Referenzfluorochrome Curcumin und ICG im Kopfbereich von Nacktmäusen nach i.v. Applikation. Nacktmäusen wurde 10 mg/kg KG BSc4352 bzw. Curcumin bzw. 1 mg/kg KG DY-730 bzw. ICG intravenös verabreicht und die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten des jeweiligen Fluorochroms im Kopfbereich 0, 5, 10 und 15 min sowie 0.5, 1, 2 und 4 h p.i. *in vivo* mithilfe eines Fluoreszenz-Kleintierscanners semiquantitativ ermittelt (MW \pm STABW, n=4) (A, B). Repräsentative Ganzkörperfluoreszenzaufnahmen einer Maus aus der jeweiligen Fluorochromgruppe mit besonderer Berücksichtigung der Kopfregion (rote Pfeile) sind in Abbildung C (BSc4352) und D (DY-730) dargestellt.

In den präparierten Gehirnen BSc4352-i.v.-applizierter Mäuse konnte BSc4352 mit einer durchschnittlichen Fluoreszenz von $0,010 \pm 0,005$ (scaled counts/s) 15 min p.i. bzw. $0,0041 \pm 0,0006$ (scaled counts/s) 4 h p.i. detektiert werden. Die Signalstärke bewegte sich dabei auf einem ähnlichen Niveau wie bei Gehirnen mannitolapplizierter Mäuse (15 min p.i.: $0,017 \pm 0,010$; 4 h p.i.: $0,0083 \pm 0,0016$) (Abb. 25A). Die leichte Abschwächung des BSc4352-Fluoreszenzsignals 4 h p.i. (vgl. 15 min p.i.) bei einer gleichbleibenden vorrangigen Lokalisation des Fluorochroms im Bereich des Frontal-, Parietal- und Temporallappens des *Telencephalons* zeigte die Aufnahme der Gesamtfluoreszenz von BSc4352 am präparierten Gehirn (Abb 25B). Dass BSc4352 im Gehirngewebe akkumuliert vorliegt, bestätigte der fluoreszenzmikroskopische Nachweis des flächig verteilten Fluorochroms in Gehirnschnitten von Mäusen, die 4 h p.i. getötet wurden. Das Fluorochrom fand sich vor allem in den Randbereichen des *Telencephalons*- im *Cortex cerebri* (Abb. 25C).

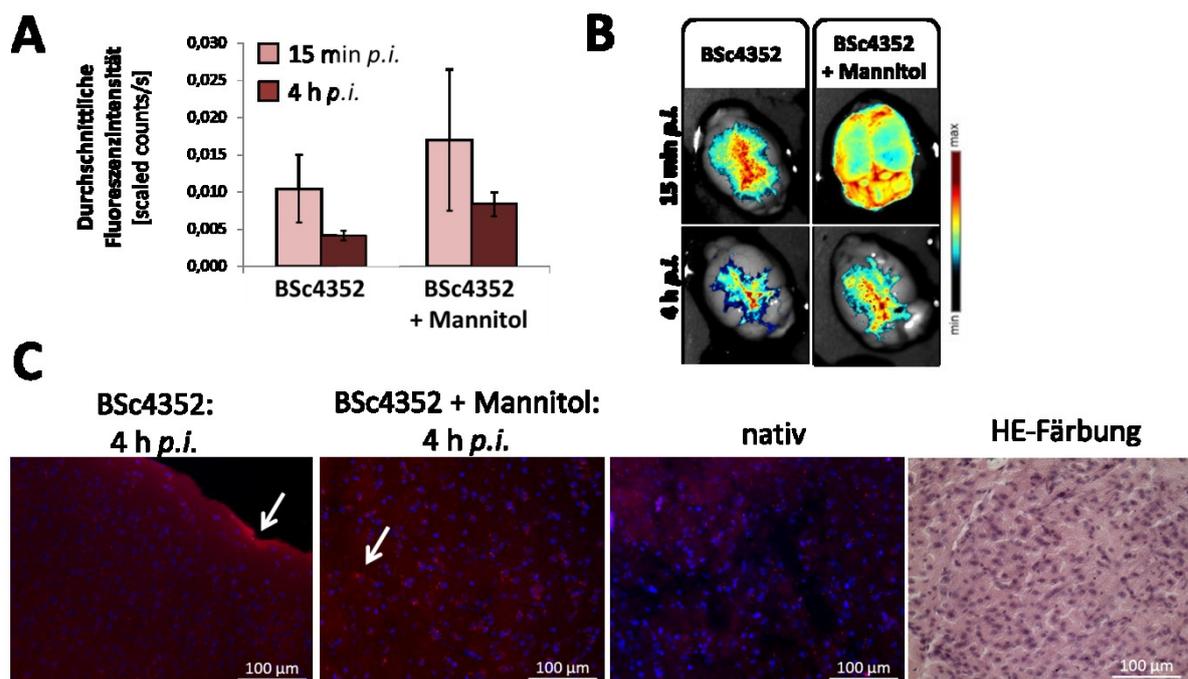


Abb. 25: BSc4352 konnte nach i.v. Applikation im Gehirngewebe von Mäusen detektiert werden. Nacktmäusen wurde 10 mg/kg KG BSc4352 i.v. verabreicht und die Tiere nach 15 min bzw. 4 h p.i. abgetötet und die Gehirne präpariert (jeweils MW \pm STABW, n=4). (A) zeigt die via Fluoreszenz-Kleintierscanner semiquantitativ ermittelten BSc4352-Fluoreszenzintensitäten der präparierten Gehirne, in (B) ist die Verteilung von BSc4352 im präparierten Gehirn durch die Aufnahme der BSc4352-Fluoreszenzintensitäten dargestellt. Fluoreszenzmikroskopisch ausgewertete Schnitte des *Telencephalons* (C) zeigen den Nachweis von BSc4352 auch noch 4 h p.i. (*Cortex cerebri*, siehe Pfeil). Blau: Zellkerne (Hoechst), rot: BSc4352. Für die Fluoreszenzbilder (B) und die Hirnschnitte (C) wurde eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme (aus n=4) des Gehirns ausgewählt.

In präparierten Augen konnte ebenso eine Akkumulation von BSc4352 festgestellt werden. Die 15 min p.i. und 4 h p.i. untersuchten Augen zeigten ähnliche Signalstärken ($0,0015 \pm 0,001$ und $0,00120 \pm 0,0006$ scaled counts/s) (Abb. 26A). Das Fluorochrom konnte fluoreszenzmikroskopisch in der Retina besonders stark innerhalb der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren und im Bereich des retinalen Pigmentepithels, aber auch mit deutlich schwächeren Fluoreszenzsignalen im Übergang der äußeren plexiformen Schicht zur inneren nukleären Schicht sowie der inneren nukleären Schicht zur inneren plexiformen Schicht und in den Randbereichen der Ganglienzellschicht detektiert werden (Abb. 26B).

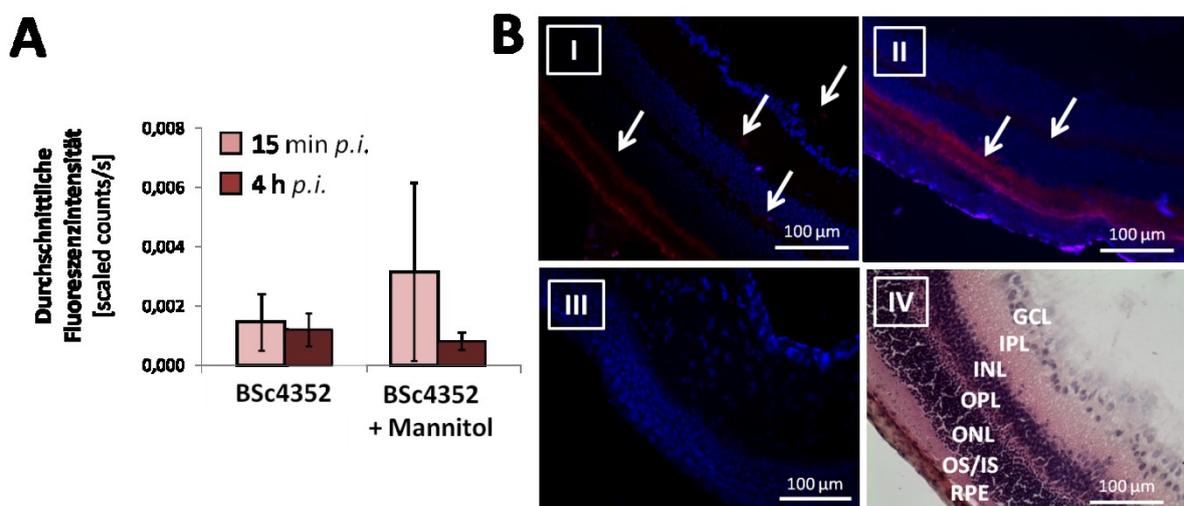


Abb. 26: Starke Anreicherung von BSc4352 im Augengewebe innerhalb der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren und im Bereich des retinalen Pigmentepithels von Mäusen nach i.v. Applikation. Nacktmäusen wurde 10 mg/kg KG BSc4352 intravenös verabreicht und die Tiere nach 15 min bzw. 4 h p.i. abgetötet. Über die Fluoreszenzintensitäten der präparierten Augen erfolgte der semiquantitative Fluoreszenznachweis des Fluorochroms via Fluoreszenz-Kleintierscanner. (A) Die *ex vivo*-Signale der Mäuseaugen (MW \pm STABW, n=4) zeigten sowohl 15 min als auch 4 h p.i. eine Detektion von BSc4352. (B) Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der retinalen BSc4352-Akkumulation (siehe Pfeile) erfolgte an Schnitten der Mäuseaugen auch 4 h p.i.. Es wurde jeweils eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme (aus n=4) des Auges für die histologische Darstellung ausgewählt. I: BSc4352 4 h p.i.; II: BSc4352+Mannitol 4 h p.i.; III: nativ; IV: HE-Färbung. Blau: Zellkerne (Hoechst), rot: BSc4352. RPE: retinales Pigmentepithel, OS: äußere Segmente der Photorezeptoren, IS: innere Segmente der Photorezeptoren, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht.

Mit einem durchschnittlichem Fluoreszenzsignal von $0,033 \pm 0,021$ (scaled counts/s) konnte DY-730 zwar *ex vivo* im Gehirn 15 min nach der i.v. Applikation detektiert werden, jedoch gefolgt von einem starken Absinken des Signals 4 h p.i. auf $0,00042 \pm 0,00009$ (scaled counts/s) (Abb. 27A), was die Darstellung der Fluoreszenzverteilung von DY-730 im gesamten Gehirn ebenso zeigte (Abb. 27B). Anhand von Hirnschnitten präparierter Gehirn konnte DY-730

weder 15 min, noch 4 h nach der i.v. Applikation im Hirngewebe nachgewiesen werden (Abb. 27C). Ein ähnliches Schema zeigt die Anflutung von DY-730 im Auge: Während DY-730 15 min p.i. im Auge *ex vivo* ($0,0080 \pm 0,0027$ scaled counts/s) und auch in den Gewebeschnitten nachweisbar war, fanden sich 4 h p.i. nur geringe Anteile des Fluorochroms im Auge ($0,00057 \pm 0,00011$ scaled counts/s) *ex vivo*. Der Fluoreszenznachweis von DY-730 in der Retina blieb nach 4 h aus (Abb. 28A, 28B).

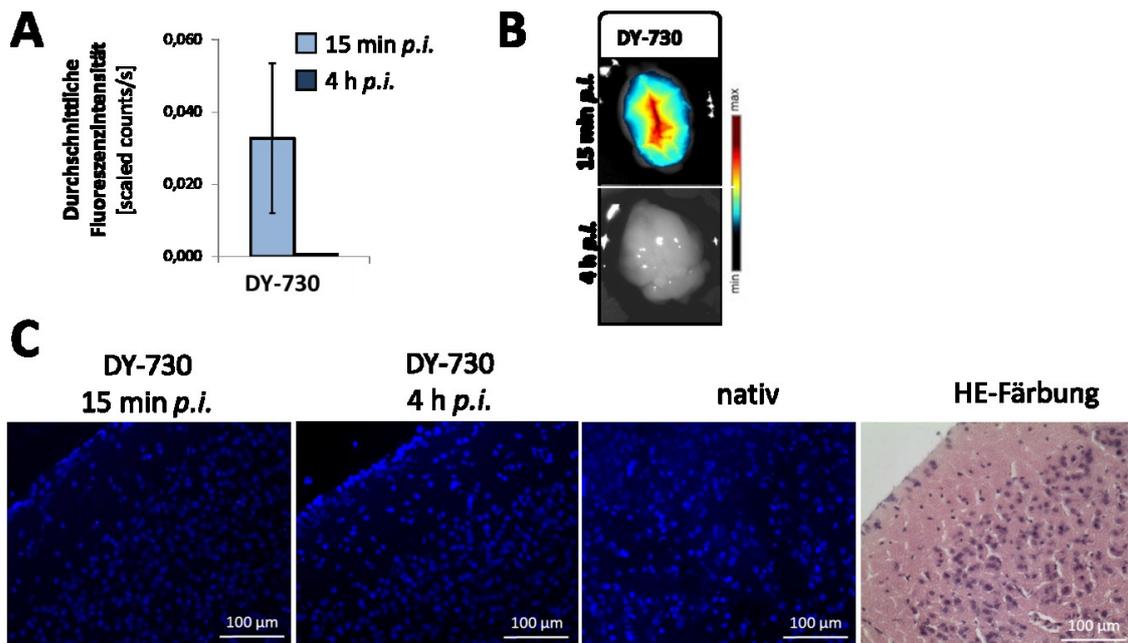


Abb. 27: Auswaschung von DY-730 aus dem Gehirngewebe von Mäusen 4 h p.i.. Nacktmäuse wurde 1 mg/kg KG DY-730 i.v. verabreicht, nach 15 min bzw. 4 h p.i. abgetötet und die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der präparierten Gehirne (MW \pm STABW, n=4) via Fluoreszenz-Kleintierscanner bestimmt (A, B) und Hirnschnitte fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (C). Blau: Zellkerne (Hoechst). Für die Fluoreszenzbilder (B) und die Hirnschnitte (C) wurde eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme (aus n=4) des Gehirns ausgewählt.

Wie bei BSc4352 unterschied sich das Niveau der durchschnittlichen Curcuminfluoreszenz 15 min und 4 h p.i. kaum voneinander (15 min p.i.: $0,0017 \pm 0,0003$; 4 h p.i.: $0,0023 \pm 0,0016$ scaled counts/s), während ICG 15 min p.i. im Telencephalon mit einer um den Faktor 10 höheren Signalstärke detektiert werden konnte als nach 4 h (15 min p.i.: $0,0052 \pm 0,0012$; 4 h p.i.: $0,00062 \pm 0,00010$ scaled counts/s) (Abb. 29A). Der Vergleich der makroskopischen Verteilung der Fluorochrome im Gehirn zeigt eine vorrangige Färbung der Gefäße durch ICG und DY-730, während bei Gehirnen BSc4352- und Curcumin-applizierter Mäuse auch außerhalb der Gefäßbahnen Fluoreszenzen detektierbar waren (Abb. 29B).

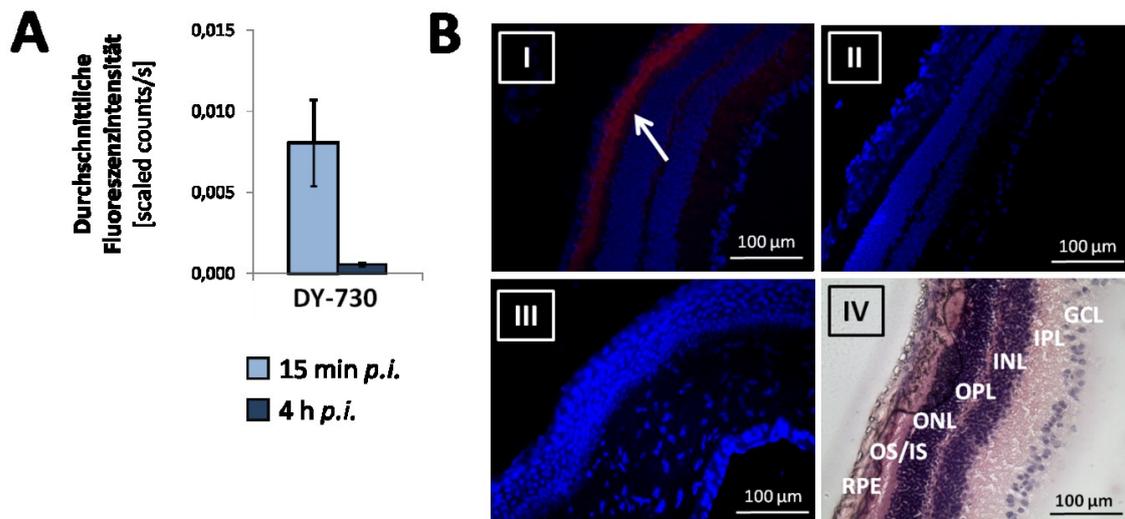


Abb. 28: Auswaschung von DY-730 aus dem Auge binnen 4 Stunden nach i.v. Applikation von Mäusen. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG DY-730 i.v. verabreicht, nach 15 min bzw. 4 h p.i. abgetötet und die Fluoreszenzintensitäten der präparierten Augen (MW \pm STABW, n=4) via Fluoreszenz-Kleintierscanner bestimmt (A) sowie angefertigte Schnitte der Mäuseaugen (eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme aus n=4) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (B). Pfeil: DY-730-Fluoreszenz. I: DY-730 15 min p.i.; II: DY-730 4 h p.i.; III: nativ; IV: HE-Färbung. Blau: Zellkerne (Hoechst), rot: DY-730. RPE: retinales Pigmentepithel, OS: äußere Segmente der Photorezeptoren, IS: innere Segmente der Photorezeptoren, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht.

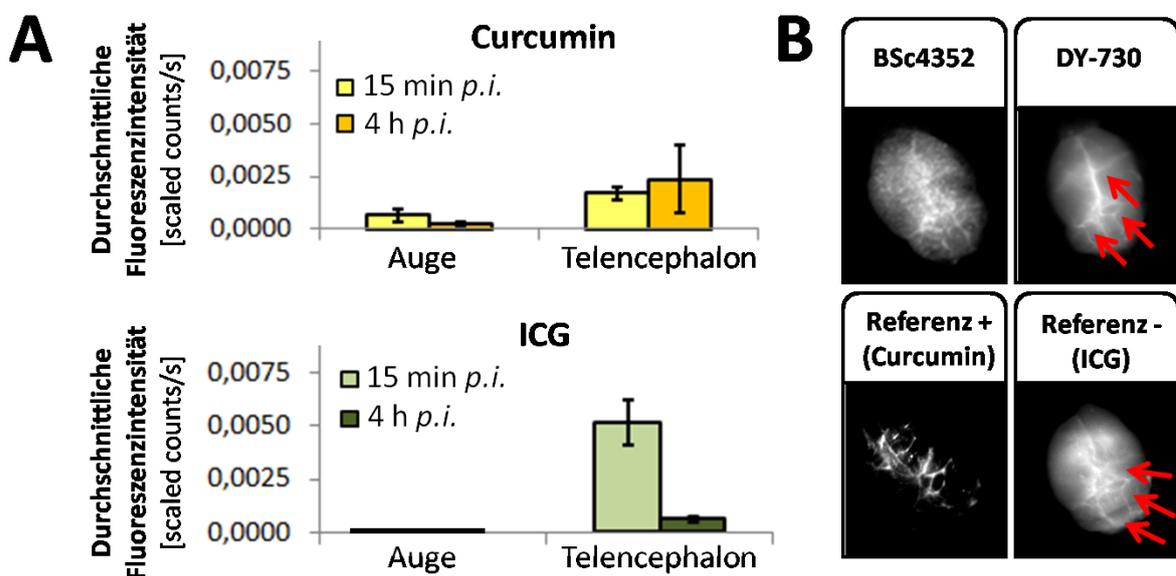


Abb. 29: Akkumulation von Curcumin im Auge und Telecephalon, schnelle Auswaschung von ICG aus Gehirn nach i.v. Applikation. Nacktmäusen wurde 10 mg/kg KG Curcumin bzw. 1 mg/kg Körpergewicht ICG i.v. verabreicht und die Tiere nach 15 min bzw. 4 h p.i. abgetötet und die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der präparierten Organe (MW \pm STABW, n=4) semiquantitativ via Fluoreszenz-Kleintierscanner ermittelt (A). Die makroskopische Fluorochromverteilung im Gehirn der Referenzsubstanzen (+: hirngängig, -: nicht hirngängig) im Vergleich zu BSc4352 und DY-730 15 min p.i. ist in (B) dargestellt, die Pfeile markieren die Gefäße.

Im Bereich des retinalen Epithels des Auges konnte nur 15 min p.i. eine Curcuminfluoreszenz im histologischen Schnitt detektiert werden (Abb. 30A). Die Anreicherung von Curcumin im Gehirn zeigte sich durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Fluorochroms im Bereich des *Cortex* des *Telencephalons*, wobei sich die im Gewebe der bereits nach 15 p.i. abgetöteten Tiere detektierte Fluorochromfluoreszenz durch stärkere, sowohl punktuell als auch flächig verbreitete Fluoreszenzsignale von den punktuellen Fluorochromsignalen 4 h p.i. unterschied (Abb. 30B). Der Nachweis von ICG in Augen- und Gehirngewebsschnitten blieb aus (Abb. 30A, 30B).

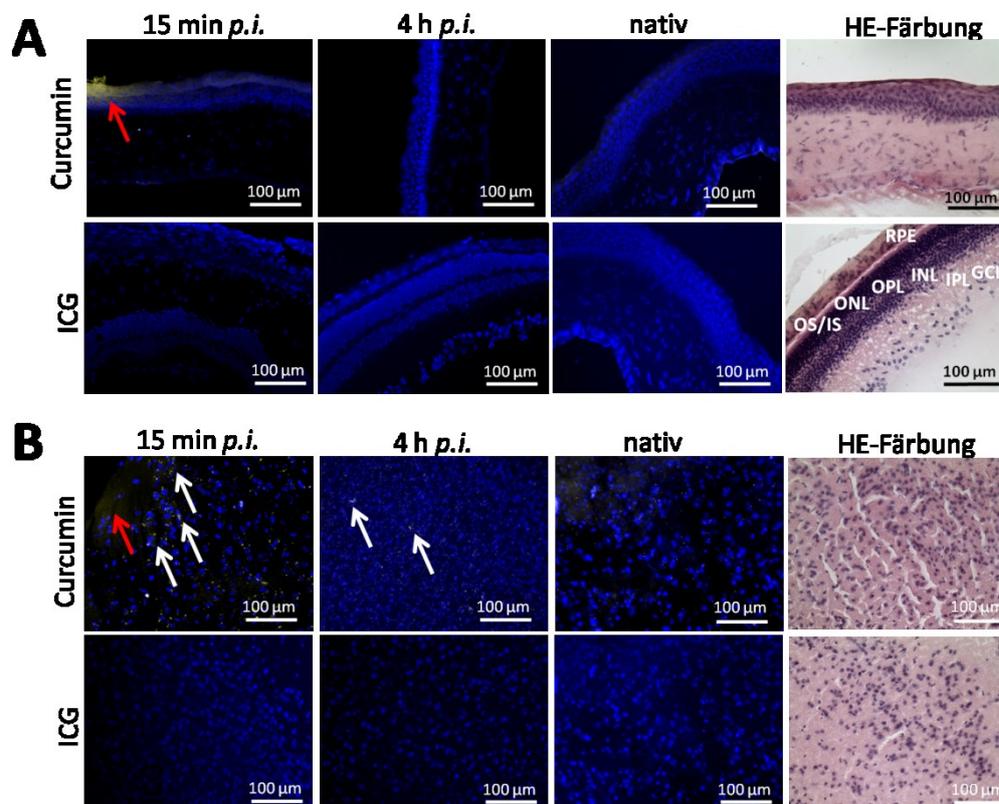


Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des als hirngängig bekannten Curcumins im Augengewebe und im *Cortex* des *Telencephalons* von Mäusen. Nacktmäusen wurde 10 mg/kg Körpergewicht Curcumin bzw. 1 mg/kg KG ICG intravenös verabreicht, die Tiere nach 15 min bzw. 4 h p.i. abgetötet und Schnitte des Auges (A) und Telencephalons (B) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Blau: Zellkerne (Hoechst), gelb: Curcumin (flächige Verteilung: roter Pfeil; punktuelle Anreicherung: weißer Pfeil). RPE: retinales Pigmentepithel, OS: äußere Segmente der Photorezeptoren, IS: innere Segmente der Photorezeptoren, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Für die Fluoreszenzbilder wurde eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme (aus n=4) des Gehirns ausgewählt.

Die Verfolgung der Anreicherung von BSc4352 im Kopfbereich nach i.n. Applikation konnte aufgrund geringer Signalstärken und stärkerer interindividueller Unterschiede in der

Signalstärke der Fluoreszenz nur mäßig beobachtet werden. Dagegen zeigte sich bei intranasal mit DY-730 applizierten Mäusen 2 h p.i. ein Anstieg der NIR-Fluoreszenz im Kopfbereich von $0,00048 \pm 0,00031$ (15 min p.a.) auf $0,009 \pm 0,004$ (4 h p.a.) und im Auge von $0,0053 \pm 0,0036$ (15 min p.a.) auf $0,013 \pm 0,003$ (120 min p.a.) (Abb. 31A). Der Transport von DY-730 nach i.n. Applikation in Bereiche des Gehirns konnte erfolgreich live während der *in vivo*-Bildgebung des Kopfbereiches der Mäuse verfolgt werden (Abb. 31B).

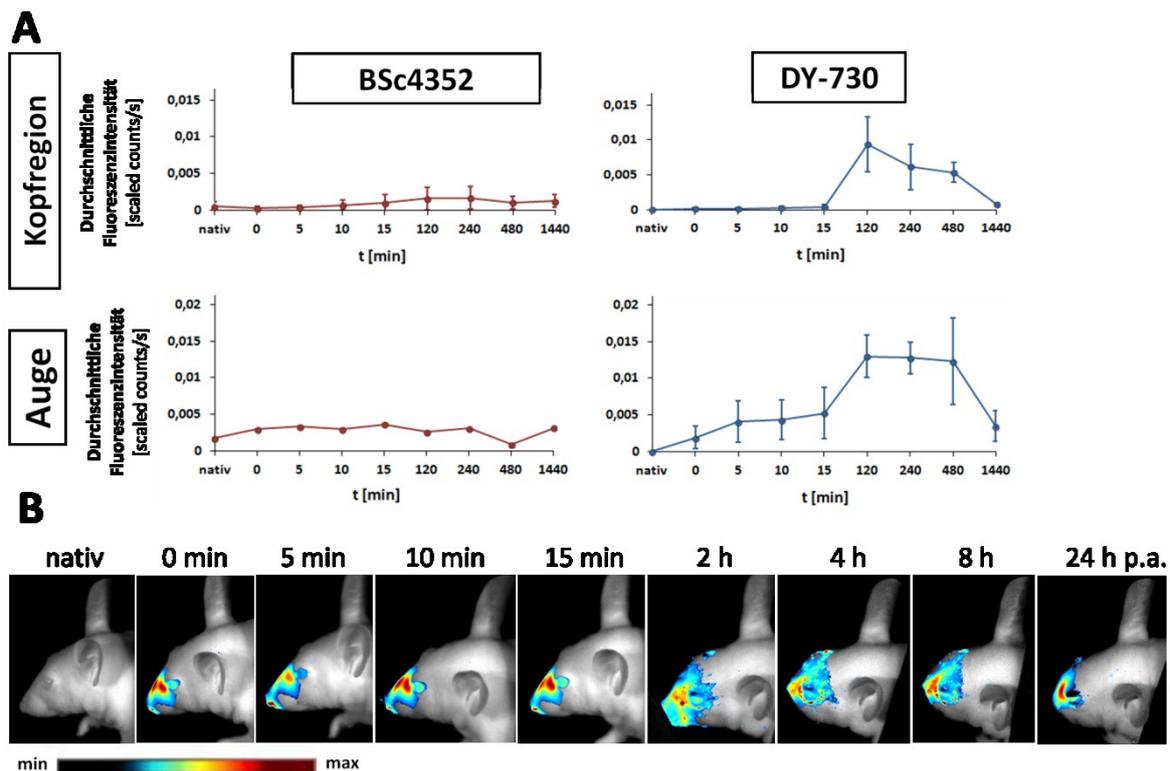


Abb. 31: *In vivo*-Fluoreszenznachweis von BSc4352 und DY-730 im Kopfbereich und Auge i.n. applizierter Mäuse. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG BSc4352 bzw. DY-730 intranasal verabreicht und die Tiere 0, 5, 10, 15 min sowie 2, 4, 8 und 24 h p.a. fluoreszenzbildgebend mit einem Fluoreszenz-Kleintierscanner vermessen und die Fluorochromanreicherung im Kopfbereich und im Auge semiquantitativ ausgewertet (MW \pm STABW, n=4). Aufgrund interindividueller Schwankungen ist für die BSc4352-Anreicherung im Auge nur ein Gruppenindividuum dargestellt, welches den Trend der Fluorochromverteilung widerspiegelt (A). Der Weg des intranasal verabreichten DY-730 im Kopfbereich ist in (B) im zeitlichen Verlauf dargestellt.

Die semiquantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale bestätigte die Anreicherung von DY-730 im Gehirn nach intranasaler Gabe: Dabei zeigte gegenüber dem *Telencephalon* ($0,0020 \pm 0,0004$ scaled counts/s) besonders der *Bulbus olfactorius* ($0,0057 \pm 0,0026$ scaled counts/s) eine Akkumulation von DY-730. Das Fluoreszenzsignal wurde 24 p.a. deutlich schwächer, jedoch konnte auch hier sowohl im *Telencephalon* als auch im *Bulbus olfactorius* das Fluorochrom detektiert werden (Abb. 32A). Übersichtsdarstellungen

zur Fluorochromverteilung im gesamten Gehirn verdeutlichten die Ausbreitung von DY-730 auf den *Bulbus olfactorius* und das *Telencephalon* (Bereich Frontal- und Parietallappen) (Abb. 32B). Ebenso konnte die Anreicherung von DY-730 im Hirngewebe in Hirnschnitten des *Bulbus olfactorius* und *Telencephalons* (Region *Cortex cerebri*) gezeigt werden, wobei die flächige Verteilung von DY-730 15 min p.a. besonders stark war (Abb. 32C).

DY-730 konnte nur geringfügig mit starken interindividuellen Schwankungen in der Fluoreszenzsignalstärke im Auge *ex vivo* detektiert werden, in Augengewebsschnitten konnte dahingegen keine Akkumulation von DY-730 festgestellt werden (Abb. nicht aufgeführt).

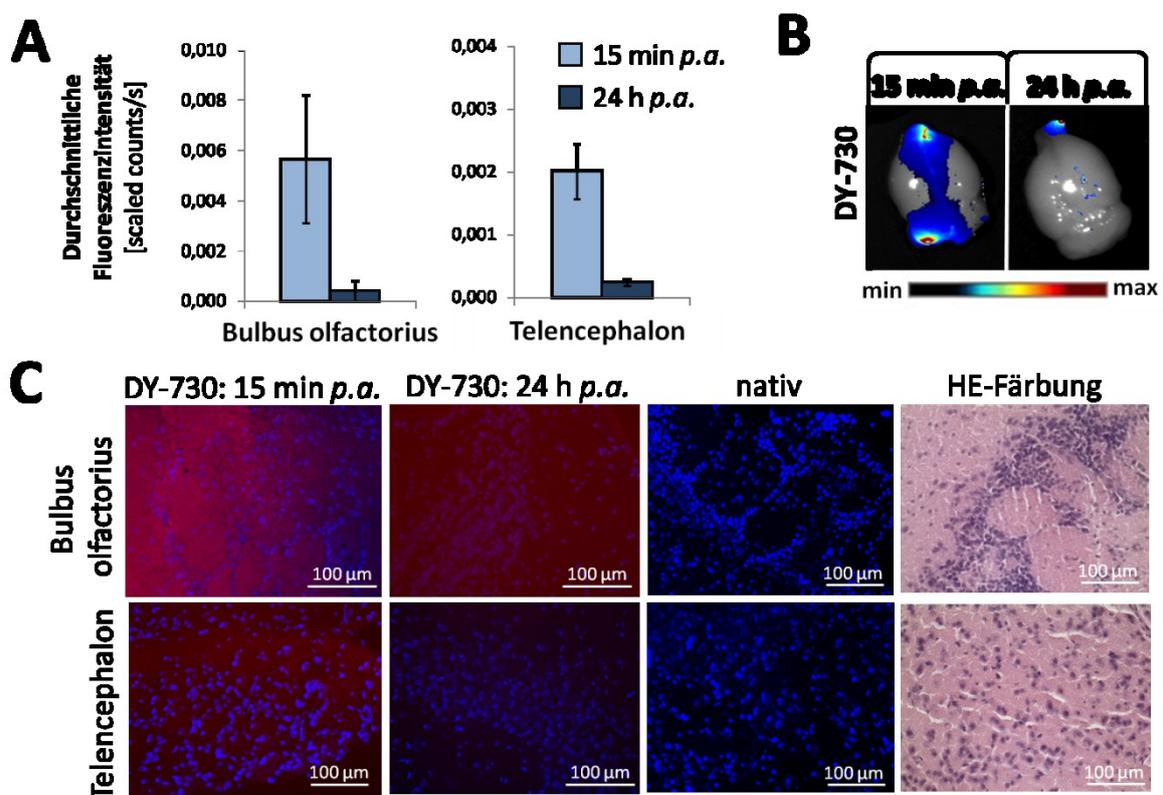


Abb. 32: Akkumulation von DY-730 im Gehirn nach i.n. Applikation in Mäusen. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG DY-730 intranasal verabreicht und die Tiere nach 15 min bzw. 24 h p.a. abgetötet. Die mittels einem Fluoreszenz-Kleintierscanner ermittelten der *ex vivo*-Signale der präparierten Gehirne (MW \pm STABW, n=4) zeigten 15 min p.a. vor allem im *Bulbus olfactorius* die Anreicherung von DY-730 (A, B), was sich fluoreszenzmikroskopisch bestätigte (C). Blau- Zellkerne, rot- DY-730. Für die histologischen Schnitte sowie die *ex vivo*-Fluoreszenzbilder wurden repräsentative Fluoreszenzaufnahmen (aus n=4) des Gehirns ausgewählt.

BSc4352 konnte im *Bulbus olfactorius* weder *ex vivo* im präparierten Organ, noch in Gewebeschnitten detektiert werden. Trotz einer im präparierten *Telencephalon* gefundenen BSc4352-Durchschnittsfluoreszenz von $0,0009 \pm 0,0004$ (15 min p.a.) bzw. $0,0008 \pm 0,0004$ (24 h p.a.) scaled counts/s sowie dem *ex vivo*-Fluoreszenznachweis im

präparierten Auge, war eine BSc4352-Lokalisation - begleitet von starken Autofluoreszenzsignalen im Hirngewebe - im Gehirn und in der Retina histologisch nicht nachweisbar (Abb. 33A). Die sehr schwachen BSc4352-Fluoreszenzsignale im *Telecephalon* und das Ausbleiben der BSc4352-Anreicherung im *Bulbus olfactorius* waren auch deutlich in der Übersichtsdarstellung der Gesamtfluoreszenz der präparierten Gehirne zu erkennen (Abb. 33B).

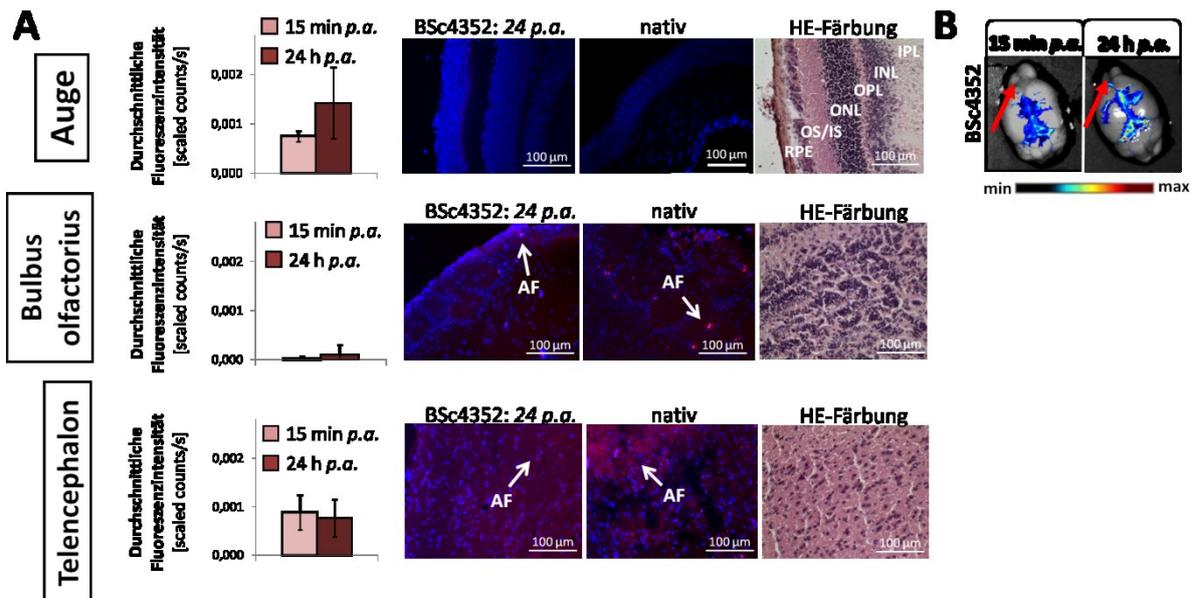


Abb. 33: BSc4352 ist im Augen- und Gehirngewebe nach i.n. Applikation in Mäusen nicht nachweisbar. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG BSc4352 intranasal verabreicht, die Tiere 15 min bzw. 24 h p.a. abgetötet und via Fluoreszenz-Kleintierscanner die *ex vivo*-Signale der präparierten Augen und Gehirne (MW \pm STABW, n=4) ermittelt und histologische Schnitte anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Blau: Zellkerne (Hoechst), rot: BSc4352. AF: Autofluoreszenz (weißer Pfeil). RPE: retinales Pigmentepithel, OS: äußere Segmente der Photorezeptoren, IS: innere Segmente der Photorezeptoren, ONL: äußere nukleäre Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleäre Schicht, IPL: innere plexiforme Schicht (A). Die schwache Fluoreszenz im Bereich des *Telencephalons* und die ausbleibende BSc4352-Fluoreszenz im *Bulbus olfactorius* (roter Pfeil) sind in der intensitätsskalierten *ex vivo*-Fluoreszenzaufnahme zu erkennen (B). Für die histologischen Schnitte sowie die *ex vivo*-Fluoreszenzbilder wurden repräsentative Fluoreszenzaufnahmen (aus n=4) des Gehirns ausgewählt.

Die als Referenz für einen intranasalen Transport in Bereiche des zentralen Nervensystems eingesetzten FITC-Dextran-Moleküle von einer definierten Molekülgröße von 4 kDa akkumulierten vor allem im *Bulbus olfactorius* ($0,0008 \pm 0,0003$ scaled counts/s). Im Auge konnte dagegen nach intranasaler Applikation keine Akkumulation von FITC-Dextran (genauso wie von ICG) *ex vivo* detektiert werden (Abb. 34A). Die makroskopische Verteilung von FITC-Dextran im Gehirn zeigte eine Anreicherung des Fluorochroms in den Randbereichen des *Telencephalons* und des *Bulbus olfactorius*, was der DY-730-Verteilung

sehr nahe kommt. Die bei intranasaler Gabe von ICG im Gehirn detektierbare *ex vivo*-Fluoreszenz des NIR-Referenzfluorochroms stellte sich im makroskopischen Überblick als vorrangige Ansammlung des Fluorochroms in den Gehirngefäßen dar (Abb. 34B).

Die Anreicherung von FITC-Dextran im *Bulbus olfactorius* (flächige Akkumulation) und *Telencephalon* (punktuelle Akkumulation) wurde durch den Nachweis des Fluorochroms in Gehirnschnitten bestärkt, wohingegen die Detektion der ICG-Fluoreszenz ausblieb (Abb. 35).

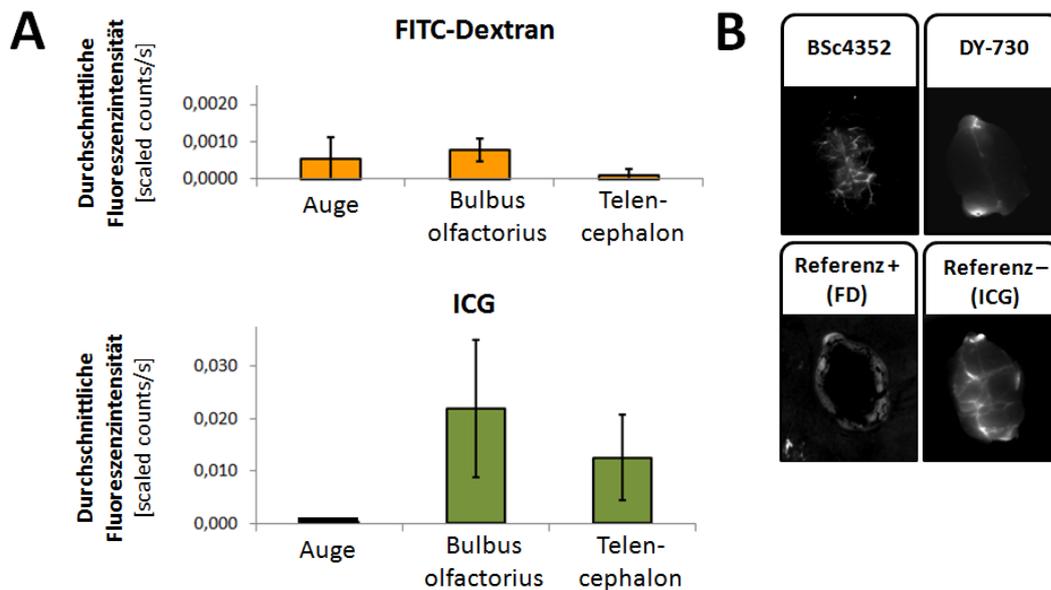


Abb. 34: Nachweis der Referenzfluorochrome FITC-Dextran und ICG im Auge und Gehirn i.n. applizierter Mäuse 15 min p.a.. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG FITC-Dextran bzw. ICG intranasal verabreicht, die Tiere nach 15 min abgetötet und die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten der Organe (MW \pm STABW, n=4) mittels einem Fluoreszenz-Kleintierscanner semiquantitativ ermittelt (A). (B) zeigt die makroskopischen Fluorochromverteilungen 15 min p.a. im Gehirn *ex vivo* von BSc4352 und DY-730 im Vergleich zu den Referenzfluorochromen FITC-Dextran (FD) und ICG (+: intranasaler Transport zum Gehirn, -: kein Zutritt zum Gehirn nach i.n. Applikation).

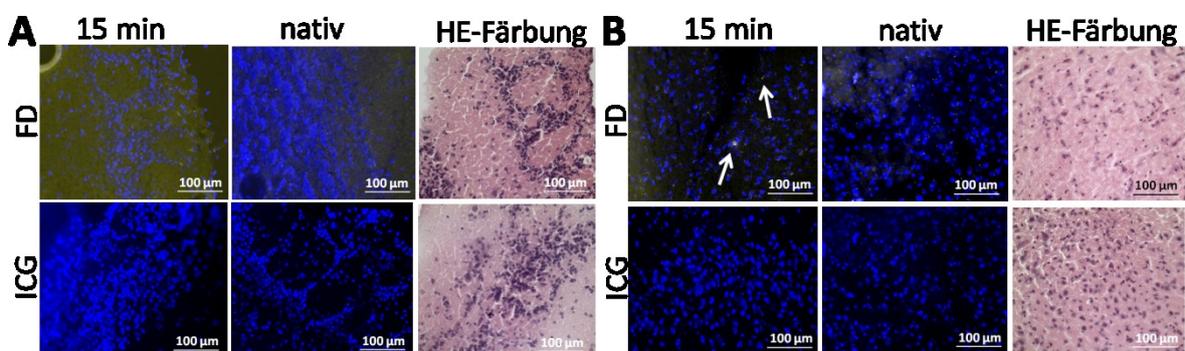


Abb. 35: Akkumulation von FITC-Dextran im *Bulbus olfactorius* nach i.n. Applikation von Mäusen. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG FITC-Dextran (4 kDa) bzw. ICG i.n. verabreicht, 15 min p.a. abgetötet und Schnitte des präparierten *Bulbus olfactorius* (A) und *Telencephalons* (Bereich *Cortex cerebri*) (B) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Blau: Zellkerne, gelb: FITC-Dextran (FD). Die FD-Fluoreszenz zeigte sich im *Bulbus olfactorius* flächig und stärker, im *Telencephalon* punktuell (Pfeil). Es wurden repräsentative Fluoreszenzaufnahmen (aus n=4) des Gehirns ausgewählt.

5.5 Verteilung und Ausscheidungswege der Fluorochrome

5.5.1 Plasmaproteinbindung der Fluorochrome

Im Vergleich zum Referenzfluorochrom ICG (Albumin: $95,2 \pm 2,5$ %, Fibrinogen: $76,1 \pm 6,1$ %, IgG: $52,3 \pm 6,5$ %) wiesen die drei VIS-Fluorochrome BSc4352, BSc4354 und BSc4511 eine geringere Bindung an die humanen Plasmaproteine Albumin, Fibrinogen und Immunglobulin G auf. Die stärkste Bindung innerhalb der genannten Stoffklasse erzielte BSc4511 an Fibrinogen mit $24,4 \pm 9,1$ %. Die NIR-Fluorochrome DY-630 und DY-730 zeigten dagegen ein ähnliches Plasmaproteinbindungsverhalten wie ICG, auffallend durch eine sehr starke Bindung an Albumin (DY-630: $81,3 \pm 4,7$ %; DY-730: $76,6 \pm 13,3$ %), gefolgt von Fibrinogen (DY-630: $35,4 \pm 13,2$ %; DY-730: $42,8 \pm 1,7$ %) und IgG (DY-630: $20,6 \pm 7,5$ %; DY-730: $52,5 \pm 12,2$ %) (Abb. 36).

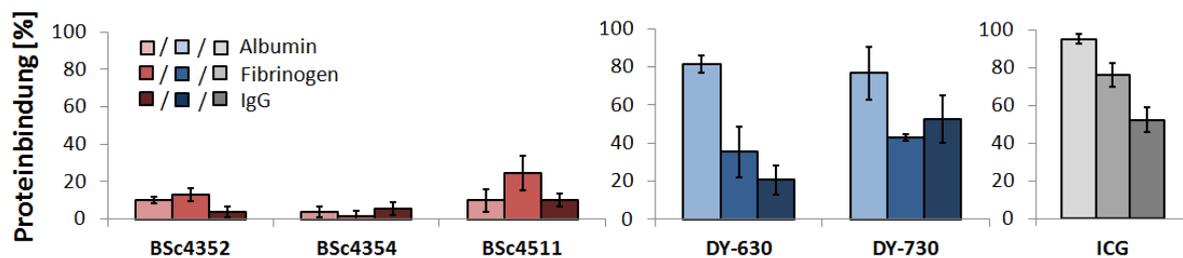


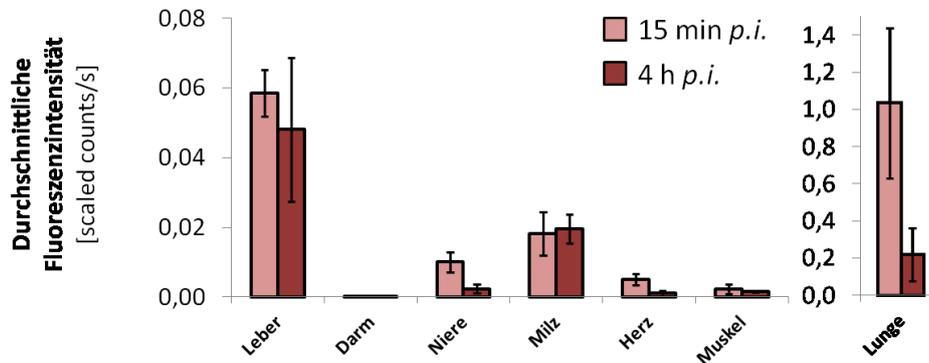
Abb. 36: Starke Plasmaproteinbindung durch die NIR-Fluorochrome. Die Bestimmung der Bindungsaffinität ($MW \pm STABW$, $n=3$) der VIS (rot)- und NIR-Fluorochrome (blau) sowie des Referenzfluorochroms ICG (grau) zu humanem Albumin (heller Balken), Fibrinogen (mittelheller Balken) und IgG (dunkler Balken) erfolgte mittels Ultrazentrifugation. Die Proteinbindung wird als der prozentuale Anteil der zuvor zu den Plasmaproteinen gegebenen Farbstoffausgangslösung angegeben, der an die Proteine binden konnte.

5.5.2 Biodistribution der Fluorochromfavoriten nach intravenöser und intranasaler Applikation

Unabhängig von der Applikationsart konnte eine besonders starke Anreicherung von BSc4352 in der Lunge detektiert werden, wobei jeweils 15 min p.a. deutlich höhere Durchschnittsfluoreszenzen des Fluorochroms gefunden wurden als nach 4 h (i.v.) bzw. 24 h (i.n.) (i.v.: 15 min p.i.: $1,0 \pm 0,4$; 4 h p.i.: $0,2 \pm 0,1$; i.n.: 15 min p.a.: $0,004 \pm 0,002$; 24 h p.a.: $0,0004 \pm 0,0002$ scaled counts/s). Nach intravenöser Verabreichung zeigte sich eine systemische Verteilung des Fluorochroms BSc4352: In absteigender Reihenfolge nach der Signalstärke geordnet, konnte das Fluorochrom in der Leber (15 min p.i.: $0,06 \pm 0,01$;

4 h p.i.: $0,05 \pm 0,02$), Milz (15 min p.i.: $0,02 \pm 0,01$; 4 h p.i.: $0,02 \pm 0,00$) und Niere (15 min p.i.: $0,01 \pm 0,00$; 4 h p.i.: $0,002 \pm 0,001$) *ex vivo* detektiert werden (Abb. 37).

Intravenöse Applikation



Intranasale Applikation

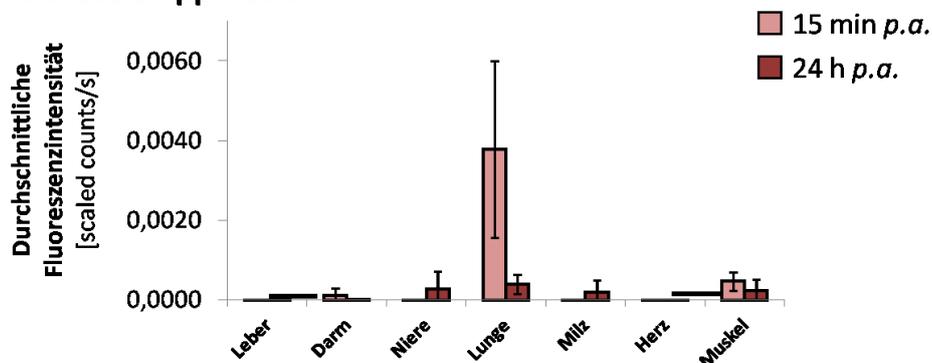


Abb. 37: Vergleichende Darstellung der Biodistribution des intravenös und intranasal verabreichten BSc4352 in Mäusen. Nacktmäusen wurde 10 mg/kg Körpergewicht BSc4352 intravenös bzw. 1 mg/kg KG BSc4352 intranasal verabreicht und die Tiere nach 15 min sowie 4 h (i.v.) und 15 min sowie 24 h (i.n.) p.a. abgetötet. Die *ex vivo* mittels Fluoreszenz-Kleintierscanner ermittelten Fluoreszenzintensitäten der präparierten Organe (MW \pm STABW; n=4) zeigen nach i.v. Gabe eine deutliche systemische Organverteilung, vor allem aber in der Lunge und den Entgiftungsorganen der Leber und Niere. Nach i.n. Gabe erfolgt eine hauptsächliche Anreicherung in der Lunge.

Die Leber erfuhr die stärkste Organanreicherung nach intravenöser Gabe von DY-730 (15 min p.i.: $0,8 \pm 1,2$ scaled counts/s), gefolgt von Niere (15 min p.i.: $0,3 \pm 0,1$ scaled counts/s) und Lunge (15 min p.i.: $0,2 \pm 0,1$ scaled counts/s). 4 h p.i. konnte das Fluorochrom gar nicht oder nur geringfügig in den Organen wiedergefunden werden. Nach intranasaler Applikation von DY-730 gelangte der Großteil des Fluorochroms in die Lunge: 15 min p.i. konnten durchschnittliche Fluoreszenzen von $0,6 \pm 0,2$ *ex vivo* gemessen werden; 24 p.a. war das Fluorochrom bei der Mehrheit der Tiere allerdings nicht mehr in der Lunge nachweisbar. Ebenso konnte DY-730 bereits 15 min p.a. in der Leber und der Niere detektiert werden. Im

Dünndarm wurde das Fluorochrom erst nach 24 h sichtbar ($0,002 \pm 0,001$ scaled counts/s) (Abb. 38).

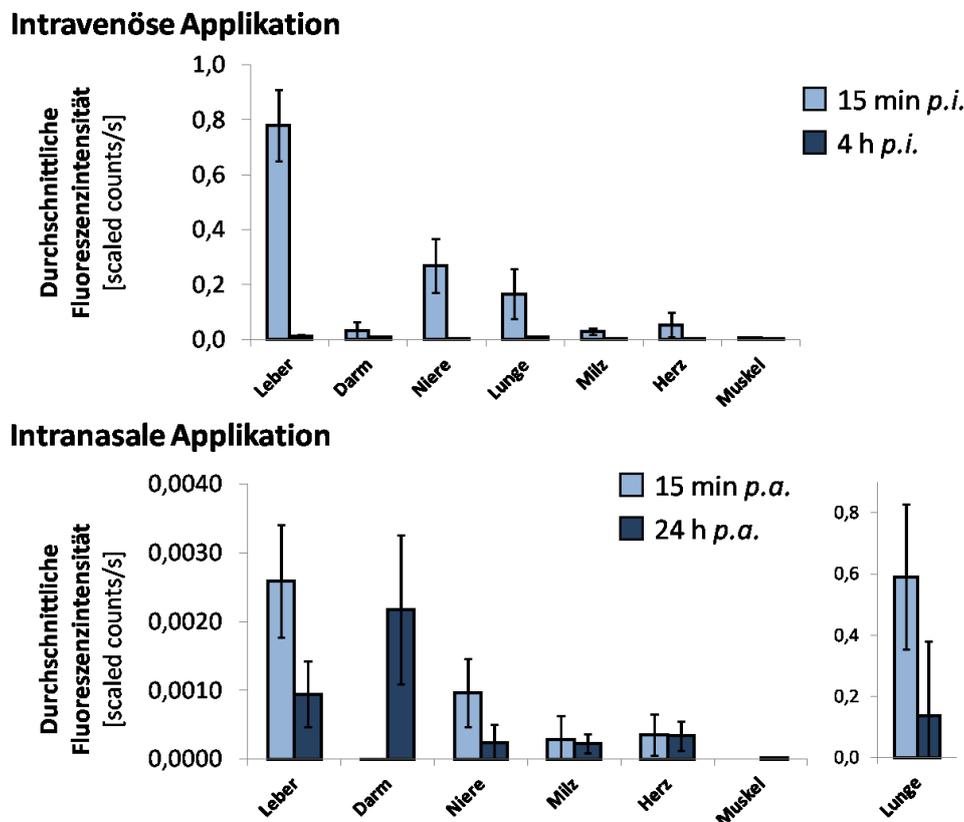


Abb. 38: Vergleichende Darstellung der Biodistribution des i.v. und i.n. verabreichten DY-730 in Mäusen. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG DY-730 i.v. und i.n. verabreicht und die Tiere nach 15 min sowie 4 h (i.v.) und 15 min sowie 24 h (i.n.) p.a. abgetötet. Die *ex vivo* mittels Fluoreszenz-Kleintierscanner ermittelten Fluoreszenzintensitäten der präparierten Organe (MW \pm STABW; n=4) zeigen, dass das besonders starke DY-730-Signal in der Leber in i.v. applizierten Mäusen in i.v. verabreichten Tieren deutlich geringer ausfällt. Die stärkste Anreicherung von DY-730 nach i.n. Gabe ist in der Lunge zu finden.

5.5.3 Bluthalbwertszeit ausgewählter NIR-Fluorochrome

Das NIR-Fluorochrom DY-730 erreichte nach etwa 14 min (Median: 13,74 min) seine halbmaximale Konzentration im Blut der Versuchsmäuse, während das um 26 kDa kleinere, aber ansonsten zu DY-730 strukturähnliche DY-630-Molekül etwa nach 8 min (Median: 7,94 min) zur Hälfte aus dem Blut eliminiert wurde (Abb. 39).

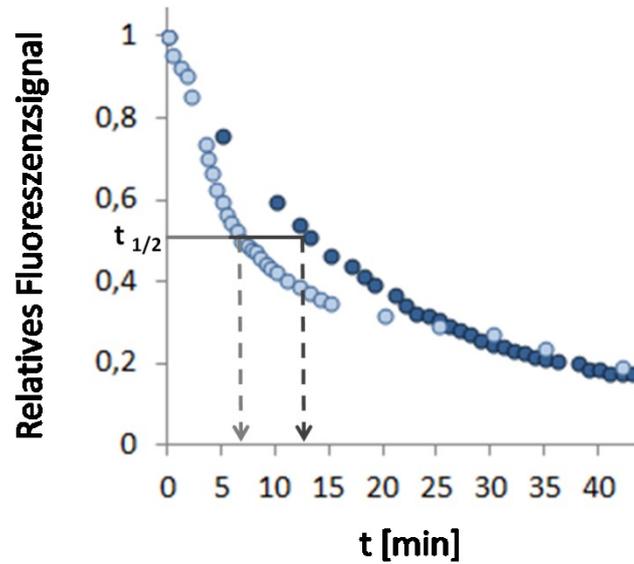


Abb. 39: Bluthalbwertszeit von DY-630 und DY-730 nach iv. Applikation in Mäusen. Nacktmäusen wurde 1 mg/kg KG DY-630 bzw. DY-730 i.v. verabreicht und die Fluorochromfluoreszenz im Auge im Zeitverlauf mit einem Fluoreszenz-Kleintierscanner *in vivo* verfolgt und semiquantitativ ausgewertet. Aus dem Zeitpunkt, an dem die Fluorochromfluoreszenz ihre halbmaximale Fluoreszenzintensität im Vgl. zur Ausgangsintensität zum Zeitpunkt 0 min p.i. erreichte, wurde die Bluthalbwertszeit über exponentielle Regression ermittelt. Dargestellt ist für jedes Fluorochrom der Zeitverlauf eines Individuums (aus n=3).

6 DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte für alle getesteten Vertreter der VIS- und NIR-Fluorochrome eine Selektivität gegenüber A β - und Tau-Aggregaten nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Vertreter der Bis(arylviny)pyrimidine die höchsten A β -bedingten Fluoreszenzsteigerungen und eine daraus resultierende geeignete Interkalationsfähigkeit mit Amyloid-Fibrillen sowie eine gute A β 1-40-Affinität. Eine vielversprechende Interkalationsfähigkeit mit aggregierten A β -Peptiden konnte ebenso für das NIR-Fluorochrom DY-730 festgestellt werden, welche sich in etwa auf dem gleichen Niveau der Interkalationsfähigkeit der Bis(arylviny)pyrazine bewegte und auch auf den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Amyloid- und auch Tau-Fibrillen an humanen AD-Gehirnschnitten mit DY-730 übertragen ließ.

Im Hinblick auf die zelluläre Unbedenklichkeit zeigten alle getesteten Fluorochrome eine bessere Biokompatibilität als der mitgeführte *post mortem*-Färbestandard MeX04, wobei vor allem BSc4352 und BSc4354 als Vertreter der Bis(arylviny)pyrazine das geringste Potential zur Auslösung zytotoxischer Effekte aufwiesen. Das Bis(arylviny)pyrimidin BSc4510 zeigte dagegen die deutlichsten Beeinträchtigungen im Dehydrogenasemetabolismus vitaler Zellen, ursächlich in einer fluorochrominduzierten verstärkten intrazellulären ROS-Bildung nach Endothelzellkontakt.

Aufgrund ihrer Affinität gegenüber A β - und Tau-Fibrillen sowie ihrer vielversprechenden *in vitro*-Biokompatibilität wurden BSc4352 und DY-730 als favorisierte Fluorochrome aus dem ursprünglichen Fluorochrompool ausgewählt. Auf intravenösem (BSc4352) bzw. intranasalem (DY-730) Weg konnte für beide Fluorochrome die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und gleichzeitig das Vordringen in die für die neuropathologischen AD-Ablagerungen relevanten Hirnareale *in vivo* in Mäusen demonstriert werden. Eine *in vivo*-Anreicherung in der Retina nach erfolgter Permeation der Blut-Retina-Schranke konnte letztendlich jedoch nur für das Fluorochrom BSc4352 nachgewiesen werden.

6.1 Selektion targetaffiner Fluorochrome für die fluoreszenzbildgebende Detektion neuropathologischer Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen

Anhand der Analyse der spektralen Eigenschaften konnten die Absorptions- und Emissionsmaxima der bisstilbenbasierten Fluorochrome BSc4352, BSc4354, BSc4504, BSc4510 und BSc4511 im visuellen Wellenlängenbereich eingeordnet werden. Für diese VIS-

Fluorochrome, vor allem für die Bis(arylvinyl)pyrimidine, konnte ein breiter Anregungspeak zwischen etwa 400 und 450 nm vermessen werden. Diese Eigenschaft erlaubt eine variable Auswahl gerätespezifischer Filtersysteme für die Fluorochromanregung. Zusätzlich konnten die bisstilbenbasierten VIS-Fluorochrome durch einen auffallend großen Stokes Shift zwischen 150 und 200 nm charakterisiert werden. Über den Verlauf der Fluoreszenzspektren der VIS-Fluorochrome kann eine Überlappung mit den Spektren endogener Fluorochrome der Zellbestandteile wie bspw. Tryptophan, Pyridoxin, Kollagen, Elastin und NADH ausgeschlossen werden. Diese Fluoreszenzeigenschaften ermöglichen eine Fluorochromdetektion mit einem vorteilhaften Signal-Rausch-Verhältnis.

Das Bis(arylvinyl)pyrazin BSc4352 wies als einziges VIS-Fluorochrom ein Emissionsmaximum über 600 nm auf. Da die Eigenfluoreszenz des Augenhintergrunds oberhalb von 600 nm mit zunehmender Wellenlänge abfällt (Hammer 2013), eignet sich das Fluorochrom BSc4352 unter den getesteten VIS-Fluorochromen besonders für den Einsatz am Auge. Hinzu kommt, dass dieses Fluorochrom aufgrund seines Fluoreszenzspektrums am ehesten eine Diskriminierung vom Fluoreszenzspektrum der Lipoproteinpigmente wie bspw. des im retinalen Epithel mit zunehmendem Alter akkumulierenden Lipofuszins zulässt (Warburton et al. 2007).

Die Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften der asymmetrischen Hemicyanine ergab eine Klassifizierung als NIR-Fluorochrome. Damit liegen die Fluorochrome DY-630, DY-730 und DY-776 mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima im Bereich des diagnostischen Fensters der optischen Bildgebung, das den spektralen Bereich von 600 nm bis 900 nm umfasst (Weissleder und Mahmood 2001). Diese spektralen Eigenschaften ermöglichen den Einsatz der NIR-Fluorochrome bei geringerer Autofluoreszenz des Umgebungsgewebes sowie höhere Eindringtiefen und daraus resultierend einen verbesserten Kontrast (Weissleder und Mahmood 2001), was ihre Eignung am Auge unterstreicht.

In Untersuchungen zum Bindungsverhalten der VIS- und NIR-Fluorochrome gegenüber aggregierten A β -Peptiden zeigten die Bis(arylvinyl)pyrimidine BSc4510 und BSc4511 die beste Interkalationsfähigkeit mit der β -Faltblattstruktur, indem sie eine hoch signifikante Verdopplung ihrer Fluoreszenzintensität durch die Interkalation mit A β induzierten. Da die A β -bedingte Fluoreszenzsteigerung für besonders spezifische A β -Liganden als ein Charakteristikum der Targetbindung beschrieben wird (Krebs et al. 2005), ist für die

Bis(arylvinyl)pyrimidine BSc4510 und BSc4511 eine vielversprechende Spezifität gegenüber A β und damit eine gute Detektierbarkeit von Amyloid-Plaques mittels molekularer Fluoreszenzbildgebung anzunehmen.

Im Vergleich zu den Bis(arylvinyl)pyrimidinen erzielten die ihnen strukturverwandten Bis(arylvinyl)pyrazine eine on target-Fluoreszenzsteigerung um einen Faktor von etwa 1,5. Strukturell unterscheiden sich die Bis(arylvinyl)pyrazine nicht nur durch ihre zentrale Pyrazin-Grundstruktur von den Bis(arylvinyl)pyrimidinen, sondern weisen auch eine deutlich linear ausgerichtete Struktur im Vergleich zu den gebeugten, pyrimidinbasierten BSc4510- und BSc4511-Molekülen auf. In dieser Konsequenz beläuft sich der Querdurchmesser der Bis(arylvinyl)pyrazine auf etwa 4 Å, während sich jener der Bis(arylvinyl)pyrimidine zwischen 8 und 9 Å bewegt. Dieser Unterschied in der Molekülbreite könnte für die leichten Unterschiede in der A β -bedingten Fluoreszenzsteigerung und damit in der passgenauen Interkalation der Bis(arylvinyl)pyrimidine und -pyrazine in die Bindungstaschen der Amyloid-Fibrillen verantwortlich sein, da bereits Korrelationen zwischen dem Durchmesser sogenannter Bindungstaschen innerhalb der Fibrillen und der Breite der potentiellen Bindungspartner beim Auftreten dieses fluoroszenzsteigernden Effekts diskutiert werden, wie Untersuchungen am Referenzfluorochrom für die A β -Bindung, Thioflavin T, zeigten (Groenning et al. 2007). Die Fluorochrome binden dabei vermutlich mit ihrer Längsachse parallel zur Längsachse der Amyloid-Fibrillen (Krebs et al. 2005). Anhand verschiedener Modellsysteme, die sich mit der Struktur von Amyloid-Fibrillen beschäftigen, werden Taschengrößen mit einem Durchmesser von 8–9 Å diskutiert, die vor allem für die spezifische Fluoreszenzänderung von Thioflavin T verantwortlich gemacht werden (Groenning et al. 2007). Andere Modelle der amyloiden Fibrillenstruktur beschreiben Protofilamente von einem Durchmesser von etwa 30 Å mit einer zentralen Bindungstasche in einer Größenordnung von 10–15 Å (Lazo und Downing 1998; Malinchik et al. 1998). Es werden allerdings auch größere Bindungstaschen vermutet, etwa bei der Formation der Protofibrillen aus den Protofilamenten bzw. bei der Reifung zu ausgebildeten Fibrillen (Jimenez et al. 2002; Lashuel et al. 2002). Die etwa 8–9 Å breiten Fluorochrome BSc4510 und BSc4511 liegen also vermutlich passgenauer in der A β -Bindungstasche als BSc4352, BSc4354 und BSc4504, was den Bis(arylvinyl)pyrimidinen eine besonders vielversprechende Spezifität gegenüber A β beschert.

Einen den der Bis(arylvinyl)pyrimidine übertreffenden fluoreszenzsteigernden Effekt in Anwesenheit von A β erfuhr MeX04. Da MeX04 einen Querdurchmesser in der gleichen Größenordnung wie Thioflavin T aufweist (Thioflavin T: 3,83 Å; MeX04 4,00 Å; beides ermittelt über die Addition der Bindungslängen) und die starke interkalationsbedingte Fluoreszenzsteigerung von Thioflavin T zusätzlich durch die Bildung von Excimeren erklärt wird (Groenning et al. 2007), könnte der gleiche Mechanismus auch bei MeX04 zu Grunde liegen. Bis(arylvinyl)pyrazine, von denen theoretisch genauso wie bei Thioflavin T und MeX04 auch zwei Moleküle in die 8 Å großen Bindungstaschen passen würden, sind vermutlich nicht in der Lage Dimere zu bilden, was sich in einer geringeren Fluoreszenzsteigerung als Konsequenz einer schwächeren Interkalation mit der Fibrillenstruktur im Vergleich zu MeX04 auswirkt.

Innerhalb der NIR-Fluorochrome konnte für das Fluorochrom DY-730 die beste Interkalationsfähigkeit nachgewiesen und als einziges NIR-Fluorochrom ein ähnliches Niveau der on target-Fluoreszenzsteigerung wie bei den VIS-Fluorochromen erreicht werden. Auffallend war dabei, dass DY-730 in Anwesenheit der aggregierten A β -Peptide eine hoch signifikante Steigerung seiner off target-Fluoreszenz um den Faktor 1,4-1,6 zeigte, während für das dem DY-730-Molekül strukturell nahezu identische DY-630, das sich nur um eine Doppelbindung in der Polymethinkette von DY-730 unterscheidet, in Anwesenheit von A β 1-42 keine und nach dem Kontakt mit A β 1-40 sogar eine verminderte Fluoreszenzintensität im Vgl. zur off target-Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Auch hier ist die Ursache im Querdurchmesser der Fluorochrome zu finden. Hierbei stehen sich Molekülbreiten von 8,81 Å (DY-630) und 9,58 Å (DY-730) gegenüber. Dieser Unterschied führt dazu, dass DY-730 sich stabiler parallel zur Längsachse der A β -Fibrillen einlagern kann. Unter Betrachtung des Jablonski-Diagramms kann in der Konsequenz die Energie, die durch die Anregung von DY-730 von den Photonen auf die Elektronen im Molekül übertragen wird und zum Erreichen eines höheren Energieniveaus führt, durch die eingeschränkte Schwingungsfreiheit nicht als Schwingungsenergie genutzt werden. Um in den Energiegrundzustand zurückzukehren, kann bei DY-730 also deutlich mehr der aufgenommenen Energie als Licht abgestrahlt werden, was letztendlich zu einer höheren Quantenausbeute führt. Die strahlungslose bzw. thermische Desaktivierung ist bei dem kleineren und damit nicht ganz so fest in der Bindungstasche gebundenem Fluorochrom

DY-630 durch die räumliche Freiheit deutlich stärker, sodass ein Teil der aufgenommenen Energie in Schwingungsenergie umgewandelt wird und die restliche Energie sich als emittierende Lichtstrahlung äußert. Ein Vergleich des Querdurchmessers von DY-630 mit denen der Bis(arylvinyl)pyrimidine zeigt jedoch eine ähnliche Größenordnung auf und dennoch konnte keine targetbedingte Fluoreszenzsteigerung für DY-630 wie für die Bis(arylvinyl)pyrimidine detektiert werden. Dies gilt auch für das Fluorochrom DY-776, das trotz seiner nahezu zu DY-730 identischen Breite eine geringere on target-Fluoreszenzsteigerung als DY-730 erfuhr. Schlussfolgernd können für die vielversprechende Interkalationsfähigkeit von DY-730 innerhalb der NIR-Fluorochrome vermutlich also nicht nur seine von der Polymethinkette im Molekül beeinflusste und mit der Fibrillentaschengröße korrelierende Molekülbreite, sondern auch die Maße seiner Längsachse sowie sterische Interaktionen funktioneller Gruppen mit der β -Faltblattstruktur verantwortlich gemacht werden.

Das Fluorochrom BSc4511 zeigte als einziges Fluorochrom in Anwesenheit von aggregierten A β 1-42-Peptiden eine im Vergleich zu A β 1-40-Peptiden signifikant stärkere on target-Fluoreszenz, während BSc4504, DY-730 und MeX04 signifikant höhere on target-Fluoreszenzen durch A β 1-40 erlangten und bei den restlichen Fluorochromen die on target-Fluoreszenzen durch A β 1-40 und A β 1-42 gleichermaßen gesteigert wurden. Da in frühen Alzheimerstadien vor allem A β 1-42-Peptide in den diffusen Plaques dominieren und reifere Amyloid-Plaques fortgeschrittener Krankheitsstadien anteilmäßig vor allem aus A β 1-40-Peptiden bestehen (Iwatsubo et al. 1994), könnte BSc4511 aufgrund der ermittelten leichten Präferenz für eine Interkalation mit A β 1-42-Fibrillen für die Frühdiagnose von *Morbus Alzheimer* besonders relevant sein. Übertragen auf die geplante Amyloid-Plaque-Detektion am humanen Augenhintergrund könnte mit diesem Fluorochrom, genauso wie mit den Fluorochromen mit nachgewiesener leichter A β 1-40-Interkalationspräferenz, BSc4504 und DY-730, beim Verfolgen der Plaque-Fluoreszenz im Krankheitsverlauf Rückschlüsse auf das Aggregationsmuster der Amyloid-Plaques und damit die Schwere des Krankheitsstadiums von *Morbus Alzheimer* erfolgen.

Mit einem Anteil von etwa 50 % an Fluorochrommolekülen (vgl. Ausgangslösung), der an aggregierte A β 1-40-Peptide binden konnte, erzielten die Fluorochrome BSc4352, BSc4504, BSc4510 und BSc4511 via Ultrafiltration die stärksten Bindungsaffinitäten aller getesteten

Fluorochrome gegenüber A β 1-40. DY-730 erreichte mit etwa 30 % an A β -gebundenen Fluorochrommolekülen die stärkste Bindung an A β 1-40 innerhalb der NIR-Fluorochrome, während die Affinität von seinem Strukturanalogon DY-630 zu A β 1-40 nur halb so stark war. Bedenkt man die bereits beschriebene vielversprechende Interkalationsfähigkeit von bspw. BSc4352, BSc4504, BSc4510, BSc4511 und DY-730 mit A β 1-40, so lassen diese Ergebnisse schlussfolgern, dass bei einer passgenauen Interkalation von Fluorochrommolekülen mit den fibrillären Strukturen zwar auch mit einer zufriedenstellenden Affinität zu rechnen ist, aber eine weniger passgenaue Interkalation - wie sie bei DY-630 anzunehmen ist - und die damit verbundene ausfallende on target-Fluoreszenzsteigerung eine Targetaffinität nicht ausschließt.

Humane Amyloid-Plaques und Tau-Ablagerungen konnten *post mortem* durch eine Färbung von AD-Hirnschnitten mit DY-730 im NIR-Bereich besser vom Umgebungsgewebe abgegrenzt werden als es durch DY-630 und DY-776 möglich war. Diese bessere Detektierbarkeit durch DY-730 lässt sich für den Plaque-Nachweis durch die nachgewiesene deutlich stärkere A β 1-40-Affinität (vgl. DY-630 und DY-776) erklären. Hinzu kommt die vielversprechende passgenaue Interkalation von DY-730 mit den fibrillären Strukturen, wodurch es nach Einlagerung in die Fibrillen aufgrund des fluoreszenzsteigernden Effektes on target zu einer Erhöhung der NIR-Fluoreszenzausbeute und daraus resultierend zu einer besseren Unterscheidung (vgl. DY-630 und DY-776) der fluoreszierenden neuropathologischen Ablagerungen vom Umgebungsgewebe kommt.

Eine sehr gute, differenzierte Darstellung der *post mortem* angefärbten Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen in humanen Gehirnschnitten konnte dagegen mit allen drei NIR-Fluorochromen unter Verwendung von Detektionsfiltern im blauen Spektralbereich vorgenommen werden. Dies ist begründet durch ein zusätzliches Absorptionsmaximum der Fluorochrome DY-630, DY-730 und DY-776 im Bereich von 450 nm. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Fluorochrom DY-630 trotz der ermittelten geringen Fähigkeit (siehe oben) zur passgenauen Interkalation in fibrilläre Strukturen durchaus in der Lage ist, mit den neuropathologischen Fibrillen zu interagieren. Aufgrund der unbefriedigenden NIR-Detektierbarkeit von DY-630 sowie DY-776 auf humanem Probenmaterial kommt für eine Anwendung im NIR-Bereich schlussfolgernd nur das gut detektierbare, targetaffine Fluorochrom DY-730 in Frage.

Zusammenfassend kann innerhalb der Bis(arylvinyl)pyrazine das Fluorochrom BSc4352, bei den Bis(arylvinyl)pyrimidinen neben BSc4510 vor allem BSc4511 und bei den asymmetrischen Hemicyaninen DY-730 als vielversprechendste Sondenvariante im Hinblick auf die anvisierte fluoreszenzbildgebende Detektion der neuropathologischen Ablagerungen hervorgehoben werden, da sie neben ihrer spektroskopischen Eignung auch durch ihre erfolgsversprechende Interkalationsfähigkeit und günstige Affinität gegenüber fibrillären Strukturen die Anforderungen an spezifische Liganden erfüllen.

6.2 Eignung der Fluorochrome für eine humane Anwendung im Hinblick auf ihre Biokompatibilität

Die Referenzsubstanz MeX04, an dessen Grundstruktur das Design der VIS-Fluorochrome angelehnt wurde, zeigte mit Abstand die stärksten zytotoxischen Effekte aller getesteten Fluorochrome, obwohl es in deutlich geringeren Konzentrationen als die restlichen Fluorochrome eingesetzt wurde. Detaillierte Zytotoxizitätsstudien zu MeX04 sind bisher in der Literatur nicht bekannt, lediglich ein Patent über eine neuartige MeX04-Formulierung gibt Hinweise auf die zellschädigende Wirkung von MeX04 (Annapragada et al. 2012), ferner wurde der unzureichende Abbau von MeX04 im Tierversuch beschrieben (Klunk et al. 2002) oder nur oberflächliche Daten zum Verhalten und den physiologischen Zustand MeX04-applizierter Tiere über kurze Beobachtungszeiträume erhoben (Sadowski et al. 2004). Damit liefern die vorliegenden Daten nicht nur erstmals eine detaillierte Übersicht über das zytotoxische Potential von MeX04 *in vitro*, sondern zeigen gleichzeitig im Vergleich von MeX04 mit den neuartigen Fluorochromen aus den Familien der Bis(arylvinyl)pyrazine, Bis(arylvinyl)pyrimidine und asymmetrischen Hemicyanine das deutlich geringere zytotoxische Potential und damit die vielversprechendere Biokompatibilität der getesteten fluorochromen A β - und Tau-Sonden auf.

Vor allem die Fluorochrome BSc4352 und BSc4354, die MeX04 strukturell am ähnlichsten sind, zeigten die geringste Beeinträchtigung des Dehydrogenasemetabolismus von Leber- und Nierenzellen, Perizyten, Zellen des Binde- und Stützgewebes und permanenten Endothelzellen im Vgl. zu den anderen getesteten Fluorochromen. Genauso wie MeX04 sind die beiden Fluorochrome linear ausgerichtet und enthalten drei aromatische Ringe. Ein Unterschied zu MeX04 besteht darin, dass BSc4352 und BSc4354 im Zentrum eine Pyrazin-

Struktur aufweisen, während MeX04 dort einen Benzolring mit einer über Sauerstoff verknüpften Methylgruppe enthält. Das im Vgl. zu BSc4352 und BSc4354 deutlich zyto- und phototoxischere BSc4510 weist ebenso eine andere Ringstruktur (Pyrimidin) als die pyrazinbasierten Moleküle auf. Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede könnte die Art des zentralen aromatischen Ringes also ausschlaggebend für die Auslösung zytotoxischer Effekte auf humane Zellen sein.

Indocyaningrün, das mit den NIR-Fluorochromen die cyanine Abstammung teilt, zeigte trotz seiner Zulassung und breiten Anwendung in der Leberfunktionsdiagnostik und Fluoreszenzangiographie (PULSION 2012) vor allem auf Endothelzellen, nasale Epithelien und Fibroblasten verhältnismäßig stärkere Beeinflussungen auf die Dehydrogenaseaktivität als die Mehrheit der acht getesteten VIS- und NIR-Fluorochrome. Dass ICG auf zellulärer Ebene zytotoxische Effekte induzieren und auch histologische und funktionelle Schäden der Retina bewirken kann, zeigten auch andere Studien zur Biokompatibilität von ICG (Matsui et al. 2007; Balaiya et al. 2009; Creuzot-Garcher et al. 2010; Ejstrup et al. 2012). Die im Durchschnitt bessere *in vitro*-Biokompatibilität der Bis(arylvinyl)pyrazine, Bis(arylvinyl)pyrimidine und asymmetrischen Hemicyanine im Vgl. zum klinisch zugelassenen ICG lässt ein geringeres Risiko für Nebenwirkungen der vorgestellten Fluorochromvarianten in einer *in vivo*-Anwendung erwarten. Ausgeschlossen von dieser Vermutung sind allerdings Modifikationen des asymmetrischen Hemicyanins DY-730, die aufgrund ihrer C18-Kette eine deutlich stärkere Beeinträchtigung auf den Dehydrogenasemetabolismus von Endothel- und Leberzellen verursachten als DY-730.

Allein durch die Bestrahlung mit Licht in der Wellenlänge entsprechend ihres Anregungsmaximums lösten die VIS- und NIR-Fluorochrome, BSc4510 ausgenommen, weder auf Endothelzellen, noch auf Perizyten phototoxische Effekte aus. MeX04 zeigte dagegen einen sehr starken Einfluss auf den Dehydrogenasemetabolismus bei gleichzeitiger Bestrahlung von permanenten Endothelzellen. Dieses Ergebnis zeigt einen weiteren Vorteil der neuartigen Fluorochrome gegenüber dem Referenzfluorochrom MeX04 hinsichtlich der Biokompatibilität auf und bestärkt eine mögliche Anwendung der Fluorochrome in der nicht-invasiven optischen Fluoreszenzbildgebung am Auge. Sowohl ursächlich dafür als auch vorteilhaft dabei ist vor allem das außerhalb des UV-Bereichs liegende Absorptionsmaximum der Fluorochrome (im Gegensatz zu MeX04), da somit der Einsatz von UV-Strahlung bei der

Fluorochromanregung am Auge vermieden werden kann, wodurch das durch UV-Strahlung ohnehin erhöhte Risiko für phototoxische Schädigungen am Auge (Wegener 1994) gering gehalten werden kann.

Die Fluorochrome BSc4510 und BSc4511 sowie DY-630 und DY-776 senkten die Vitalität von primären Endothelzellen vor allem nach längeren Inkubationszeiträumen stark und induzierten gleichzeitig eine erhöhte ROS-Produktion in der Zelle im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Bis(arylvinyl)pyrazine BSc4352 und BSc4354 zeigten dagegen auf Primärendothelien keine potentiell zytotoxischen Effekte und ein zum Ausgangszustand unverändertes intrazelluläres ROS-Niveau. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die fluorochromassoziierte Erhöhung der intrazellulären ROS-Spiegel mit der Auslösung zytotoxischer Effekte korreliert. Damit wird nicht nur die ROS-Sensitivität von HUVEC verdeutlicht (Wadsworth 2008), sondern auch die Beteiligung von ROS an der Zytotoxizität der oben genannten Fluorochrome demonstriert. Die durch ROS induzierten Protein- und Lipidperoxidationen führen dabei zu langfristigen Zellschädigungen, die in der Konsequenz ein Absterben der Zelle bewirken (Halliwell und Chirico 1993).

Für das Fluorochrom BSc4510, für das zuvor starke zytotoxische Effekte auf primäre Endothelzellen detektiert werden konnten, wurde eine besonders starke Akkumulation in Endothelzellen im Vgl. zu den anderen Fluorochromen nachgewiesen. Neben dem bereits beschriebenen Zusammenhang der Auslösung erhöhter intrazellulärer ROS-Spiegel und dem zytotoxischen Potential der Fluorochrome könnte die verstärkte Anreicherung von BSc4510 in der Zelle zusätzlich ausschlaggebend für die zytotoxischen Effekte dieses Fluorochroms auf Endothelien gewesen sein.

Das auf HUVEC zytotoxische Fluorochrom BSc4510 war desweiteren in der Lage, die Expression der NADH-Chinon-Oxidoreduktase-1 (NQO1) herunterzuregulieren. Das auf HUVEC nur potentiell zytotoxische Fluorochrom DY-730 induzierte dagegen eine Expressionssteigerung dieses Gens, die durch das auf HUVEC biokompatible Bis(arylvinyl)pyrazin BSc4352 noch deutlich verstärkt werden konnte. Dieses Ergebnis bestärkt die Hypothese, dass die ausbleibende bzw. stattfindende Induktion von oxidativem Stress maßgeblich die Verträglichkeit der acht Fluorochromfavoriten gegenüber Endothelien bestimmt. Die antioxidativ wirkende NQO1 kann über eine Zwei-Elektronen-Reduktion mit NADH bzw. NADPH als Elektronendonator durch ROS verursachte oxidative Schäden

verhindern (Joseph und Jaiswal 1994). Ein denkbarer Signalweg dabei wäre, dass die Fluorochrome BSc4352 und DY-730 die Zerstörung eines Komplexes aus den Transkriptionsfaktoren Keap1 und Nrf2 veranlassen können. Auf diese Weise kann der Transkriptionsfaktor Nrf2 in den Zellkern translozieren, dort mit Vertretern der small-MAF-Proteinfamilie heterodimerisieren und letztendlich durch die Bindung an das Antioxidative Response Element die Expression von NQO1 induzieren (Wakabayashi et al. 2004). Durch das zytotoxisch wirkende Fluorochrom BSc4510 bleibt der Keap1-Nrf2-Komplex vermutlich unangetastet, was zum Ausbleiben der Lokalisation von Nrf2 in den Zellkern und auch der Interaktion von Nrf2 mit dem Antioxidative Response Element führt. Keap1 vermittelt dabei die Ubiquitinierung und anschließende Degradation von Nrf2; die Expression von NQO1 wird nicht induziert (Kobayashi und Yamamoto 2005). Bei der zytotoxischen Wirkung von BSc4510 auf Endothelien handelt es sich also um einen synergistischen Effekt: die durch das Fluorochrom induzierte ROS-Bildung kann durch die gleichzeitige Herunterregulation der Genexpression von NQO1 nicht ausgeglichen werden, sondern führt letztendlich zu den beschriebenen Zellschädigungen.

Das nicht zytotoxische BSc4352 verminderte die Genexpression des Ferritin-assoziierten FTH1 in HUVEC, während das potentiell zytotoxische Fluorochrom DY-730 und zytotoxische Fluorochrom BSc4510 mit einer Hochregulation dieses Gens reagierten. FTH1 ist in der Lage, den Signalweg c-Jun N-terminaler Kinasen zu inhibieren, wodurch Stressantworten wie bspw. die Apoptose oder Entzündung ebenfalls gehemmt werden (Liu et al. 2012). Bei der durch BSc4352 verminderten Expression von FTH1 können somit die Stresssignale innerhalb der Zelle weitergeleitet werden und durch entsprechende Zellantworten Schutzmechanismen angeschaltet werden, resultierend in einem Ausbleiben einer Vitalitätsbeeinträchtigung.

Das zytotoxische Fluorochrom BSc4510 bewirkte außerdem starke Expressionssteigerungen von Apoptose-relevanten Genen (Fas und Caspase 1), entzündungsrelevanten (IL-6, IL-8, CRP) sowie an DNA-Reparaturmechanismus beteiligten Signalmolekülen (CHEK1, CDKN1A). Vermutlich veranlasste die extreme Apoptosereaktion einen zu starken Zelluntergang, was sich letztendlich in einem starken Absinken der Zahl vitaler Endothelzellen äußerte. Die durch BSc4510 gesteigerte intrazelluläre ROS-Produktion erhöhte das Risiko für Basenschäden und Einzelstrangbrüche in der DNA (Krokan und Bjoras 2013), was die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen verlangte,

welche aber in diesem Fall vermutlich nicht ausreichen um die genomische Stabilität in der Zelle zu gewährleisten.

Schlussfolgernd zeigen diese Ergebnisse zur Beeinflussung der Genexpression stressrelevanter Enzyme, dass die fluorochrominduzierte Anschaltung von Schutzmechanismen wie bspw. die Hochregulation antioxidativ wirkender Enzyme das geringe zytotoxische Potential von BSc4352 begründet und daher für BSc4352 eine vielversprechende Prognose hinsichtlich der Biokompatibilität und einem Einsatz in einer humanen Anwendung zulässt. Dadurch, dass das Fluorochrom DY-730 in der Lage ist, antioxidative Schutzmechanismen zu aktivieren, aber gleichermaßen auch viele stressrelevante Enzyme in ihrer Expression durch DY-730 unbeeinflusst blieben, sind die *in vitro* ermittelten potentiell zytotoxischen Effekte von DY-730 als weniger kritisch zu betrachten als beispielsweise die Biokompatibilitätsprognose für BSc4510: Unter dem Gesichtspunkt der detektierten BSc4510-vermittelten Inhibition von bspw. zur Bekämpfung von oxidativem Stress relevanten Signalwegen und der gleichzeitig durch BSc4510 ausgelösten überschießenden Stressantworten, ist *in vivo* mit einer gesunden Abwehr der Zelle gegen dieses Fluorochrom nach einer BSc4510-Applikation eher nicht zu rechnen.

Unabhängig von ihrem zytotoxischen Potential auf Endothelzellen waren sowohl das auf HUVEC nicht zytotoxische Fluorochrom BSc4352, das potentiell zytotoxische Fluorochrom DY-730 als auch das zytotoxische Fluorochrom BSc4510 in der Lage, in der Dual-Luciferase-Reportergenanalyse einen GSTT2-Promotor zu aktivieren. Auffallend dabei war allerdings die Signifikanz in der Steigerung der GSTT2-Promotoraktivität durch BSc4510, die bei BSc4352 und DY-730 ausblieb. Neben der Konjugation der Fluorochrome mit Glutathion besitzen Glutathion-S-Transferasen wie GSTT2 Glutathion-Peroxidaseaktivität, wodurch sie bspw. Lipidperoxidationsprodukte zu ihren jeweiligen Alkoholen reduzieren und damit durch oxidativen Stress verursachten Schäden entgegen wirken können (Prohaska 1980; Prabhu et al. 2004). Bedenkt man die durch BSc4510 gesteigerten intrazellulären ROS-Spiegel in Endothelzellen, so ist vor allem im Fall von BSc4510 die Steigerung der GSTT2-Promotoraktivität als eine adaptive Antwort auf Stress zu werten. ROS können Glutathion-S-Transferasen aktivieren, d.h. BSc4510 ist als GST-Aktivator auch gleichzeitig ein GST-Substrat (Hayes und Pulford 1995; Hayes und Strange 1995). Die auf mRNA-Ebene nachgewiesene Induktion endogener Glutathion-S-Transferasen durch BSc4352 und BSc4510

unterstützt dieses Ergebnis zusätzlich. Betrachtet man hierzu gleichzeitig das Ergebnis, dass neben BSc4352, BSc4510 und DY-730 auch die anderen getesteten Fluorochrome aus den Familien der Bis(arylvinyl)pyrazine, Bis(arylvinyl)pyrimidine und asymmetrischen Hemicyanine ähnlich wie ICG den Dehydrogenasemetabolismus humaner Hepatozyten nicht kritisch beeinflussten und die Tatsache, dass GSTT2 wie weitere entgiftend wirkende Phase-II-Enzyme vor allem in der Leber exprimiert werden (Hussey und Hayes 1992; Ketterer 1998; Josephy 2010), so ist - übertragen auf die *in vivo*-Situation - für die Fluorochrome vermutlich mit einer zügigen Metabolisierung durch hepatozelluläre Enzyme des Phase-I- und II-Metabolismus zu rechnen. Auch ICG wird durch mikrosomale Leberenzyme rasch abgebaut (Wheeler et al. 1958; Ott 1998; Müller 2007) und ist daher für den Organismus als durchaus biokompatibel einzustufen. Dafür sprechen auch die sehr hoch angesetzten LD50-Werte für Tiere von 50-80 mg/kg (Drugsite-Trust 2012). Aufgrund ihrer Fähigkeit, ihre Metabolisierung und Ausscheidung aus dem Körper über die Aktivierung von Biotransformationsreaktionen zu unterstützen, kann für die Fluorochrome *in vivo* von einer Minimierung der *in vitro* detektierten zytotoxischen Effekte ausgegangen werden.

Nach i.v.-Applikation von DY-730 in Mäusen reicherte sich ein besonders großer Anteil des Fluorochroms in der Leber an. Diese Akkumulation von DY-730 war 15 min p.i. besonders stark, während das Fluorochrom 4 h p.i. nur noch geringfügig in der Leber nachweisbar war. Dieses Ergebnis gibt einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung der Leber bei der Verstoffwechselung des lipophilen Fluorochroms. Nach der ersten Leberpassage scheint ein Großteil des asymmetrischen Hemicyanins im Zuge der Biotransformationsreaktionen in der Leber abgebaut worden zu sein.

Nur ein geringerer Teil von DY-730 wurde von den i.v. applizierten Mäusen renal ausgeschieden. Dies ist neben der Lipophilie der Substanz auch mit dem Plasmaproteinbindungsverhalten dieses Fluorochroms zu erklären: Die asymmetrischen Hemicyanine zeigten gegenüber humanem Albumin, Fibrinogen und IgG eine ähnlich hohe Affinität wie ICG. Die Fluorochrome DY-630 und DY-730 haben mit ICG die cyanine Grundstruktur und das Vorhandensein von Sulfonsäuregruppen gemeinsam - Strukturmerkmale, die möglicherweise zu einem ähnlichen Plasmaproteinbindungsverhalten führen. Bei einer sehr starken Bindung an Albumin erlangen die cyaninen Fluorochrome wie bspw. DY-730 eine Molekülgröße von über 60 kDa, wodurch dem Molekül eine glomeruläre Filtration in der

Niere verwehrt bleibt. Auch für ICG wird eine alleinige hepatobiliäre Ausscheidung beschrieben (Wheeler et al. 1958; Caesar et al. 1961; Ott 1998; Müller 2007). Somit ist anzunehmen, dass die Elimination der asymmetrischen Hemicyanine, im Speziellen von DY-730, aus dem Körper hauptsächlich durch die Biotransformation in der Leber und über die Ausscheidung mit der Gallenflüssigkeit und den Darm realisiert wird.

Für die beiden asymmetrischen Hemicyanine DY-630 und DY-730 konnte eine Bluthalbwertszeit ermittelt werden, die einen Minutenwert von 15 nicht überschreitet. Die an Plasmaproteine gebundenen Fluorochrome werden vermutlich zusätzlich vom Mononukleären Phagozytensystem erkannt und schnell aus dem Körper eliminiert. Die schnelle Auswaschung aus dem Körper stellt eine weitere Parallele zum zugelassenen ICG (Cherrick et al. 1960) dar und eröffnet damit den asymmetrischen Hemicyaninen eine sehr gute *in vivo*-Biokompatibilitätsprognose.

Das VIS-Fluorochrom BSc4352 konnte nach 4 h p.i. in ähnlichen Fluoreszenzsignalstärken in der Leber detektiert werden wie 15 min p.i., während DY-730 nach 4 h in der Leber kaum noch nachweisbar war. Daher ist für BSc4352 eine deutlich längere Verweildauer im Körper als bei DY-730 anzunehmen, möglicherweise beeinflusst von einem geringeren Metabolisierungsgrad in der Leber. Durch das bereits beschriebene geringe zytotoxische Potential von BSc4352 dürfte dies für eine positive *in vivo*-Biokompatibilitätsprognose nicht hinderlich sein.

Besonders starke BSc4352-Fluoreszenzsignale konnten nach i.v. Applikation in der Lunge detektiert werden. Alveolarmakrophagen, die am Epithel der Lungenkapillaren angeheftet sind, könnten das Fluorochrom als Fremdstoff erkannt haben und daraufhin in die Lungenbläschen eingewandert sein. Da BSc4352 wie die anderen VIS-Fluorochrome im Vergleich zu den asymmetrischen Hemicyaninen nur ein schwaches Plasmaproteinbindungsverhalten gezeigt hat, ist diese Reaktion des Mononukleären Phagozytensystem vermutlich weniger auf Bindung an Plasmaproteine zurückzuführen. Dieses Ergebnis zeigt jedoch, dass die unspezifische Immunabwehr an der Elimination von BSc4352 aus dem Körper genauso beteiligt ist wie bei DY-730, wodurch langfristige Schäden durch eine dauerhafte Anreicherung der Fluorochrome *in vivo* ausgeschlossen werden können.

Nach i.n. Gabe waren sowohl BSc4352 als auch DY-730 in geringeren Fluoreszenzsignalstärken (im Vgl. zu i.v.) und (vor allem BSc4352) in deutlich weniger Organen nachweisbar. Dies bedeutet, dass eine systemische Verteilung der Fluorochrome und damit das Risiko für Nebenwirkungen in den Zielgeweben fernen Organsystemen durch eine intranasale Applikationsform minimiert werden kann.

Wie schon bei den Erläuterungen zur Biodistribution der Fluorochrome angedeutet, zeigte das asymmetrische Hemicyanin DY-730 vor allem an humanes Albumin eine sehr starke über Ultrafiltration ermittelte Plasmaproteinbindung mit einem Anteil an etwa 80 % gebundenen Fluorochrommolekülen (vgl. Ausgangslösung) und eine Bindung von etwa der Hälfte der DY-730-Fluorochrommoleküle an humanes Fibrinogen und IgG. Für das Bis(arylvinyl)pyrazin BSc4352 konnten dagegen ähnlich wie für die ihm strukturverwandten Fluorochrome BSc4354 und BSc4511 mit einem Proteinbindungsanteil kleiner als 12 % nur eine schwache Bindung an die humanen Plasmaproteine Albumin, Fibrinogen und IgG nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist mit den Unterschieden in der Lipophilie von BSc4352 und DY-730 zu erklären, da die Bindung an Plasmaproteine mit einem steigend lipophilem Charakter von Substanzen zunimmt (Hamann et al. 2011). Ersichtlich ist dies an den experimentell ermittelten LogP-Werten der Fluorochrome, wobei BSc4352 mit einem LogP von etwa 1,3 und einer daraus resultierenden nur mäßigen Lipophilie dem deutlich lipophileren DY-730 mit einem LogP-Wert von etwa 5,2 gegenübersteht. In der Konsequenz daraus ist aufgrund dieser beschriebenen starken Affinität von DY-730 zu bspw. Albumin gemeinsam mit dem beschriebenen zügigen Eliminationsverhalten von DY-730 aus dem Körper nach einer i.v. Applikation von DY-730 mit einer Limitation der Bioverfügbarkeit dieses Fluorochroms zu rechnen. Inwiefern diese Überlegung die für eine zufriedenstellende Darstellung von Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen notwendige Applikationsdosis beeinflusst, könnten pharmakokinetische Studien mit radioaktiv markierten Fluorochromen beurteilen. Für BSc4352 sind aufgrund des geringen Grades an Plasmaproteinbindung und der verglichen mit DY-730 längeren Verweildauer im Körper keine Einschränkungen in der Bioverfügbarkeit zu erwarten.

Zusammenfassend kann innerhalb der VIS-Fluorochrome das Bis(arylvinyl)pyrazin BSc4352 als besonders biokompatibel hervorgehoben werden, da es sich vor allem aufgrund seiner zellulären Unbedenklichkeit gegenüber Endothelzellen, die nach i.v. Applikation den

ersten Kontakt des Körpers mit dem Fluorochrom darstellen, und der Aktivierung stressrelevanter Schutzmechanismen der Zelle für eine i.v. Applikation eignet. Mit einer ähnlichen Prognose ist für die *in vivo*-Biokompatibilität zu rechnen: gemessen an den für die *in vivo*-Fluoreszenzbildgebung von neuropathologischen Alzheimerablagerungen verabreichten Dosen, die sich im Tierversuch zwischen 1-10 mg/kg KG bewegen (Klunk et al. 2002; Ran et al. 2009; Okamura et al. 2011), sind die im Zytotoxizitätsscreening eingesetzten *in vitro*-Konzentrationen um 100 μM realistisch gewählt, da sie unter Berücksichtigung des Blutvolumens der Maus einer einmaligen i.v.-Injektion von 5 mg/kg entsprechen.

Innerhalb der asymmetrischen Hemicyanine zeigte DY-730 die günstigste Biokompatibilität. Neben der Aktivierung von vor allem antioxidativ wirkenden Signalmolekülen nach Fluorochromkontakt der Zelle sind auch aufgrund der vor allem durch effektive Biotransformationsreaktionen bedingten kurzen Verweildauer des Fluorochroms im Körper die *in vitro* nach längeren Inkubationszeiträumen detektierten potentiell zytotoxischen Effekte auf Endothelzellen und nasale Epithelien bei einer *in vivo*-Anwendung vermutlich nicht zu erwarten.

6.3 Potential der Fluorochrome für die *in vivo*-Bildgebung von *Morbus Alzheimer* über das Auge

Das Fluorochrom BSc4352 konnte sowohl 15 min als auch 4 h p.i. im Gewebe des *Telencephalons* und der Retina histologisch nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass BSc4352 nach i.v. Applikation die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Retina-Schranke erfolgreich überwinden konnte. Diese Annahme wird durch den Verlauf und der Stärke der BSc4352-Fluoreszenzsignale im Kopfbereich *in vivo* und auch im präparierten Gehirn *ex vivo* von BSc4352-Mäusen unterstützt, welche sich nicht von denjenigen BSc4352-Mäusen unterschied, die gleichzeitig eine osmotische Öffnung der Blut-Hirn-Schranke erfahren haben. Förderlich für die Überwindung der Blut-Hirn/Retina-Schranke war dabei vermutlich die Ladungsfreiheit von BSc4352, da die Durchlässigkeit zerebraler Kapillaren für neutrale oder positiv geladene Moleküle im Vgl. zu negativ geladenen Substanzen erhöht ist (Hawkins und Davis 2005). Da die topologischen polaren Oberflächenmaße einer Substanz für eine potentielle Hirngängigkeit 60 - 70 \AA^2 nicht überschreiten sollten (Kelder et al. 1999), ist der deutlich unter 70 \AA^2 liegende TPSA-Wert von BSc4352 als eine weitere vorteilhafte

Eigenschaft für das Hirngängigkeitspotential dieses Fluorochroms zu werten. Hinzu kommt das Molekulargewicht von BSc4352, das mit etwa 370 g/mol nicht nur den Grenzwert der maximalen Größe von transportierbaren Molekülen von 500 g/mol unterschreitet (Pardridge 2003), sondern auch nahezu identisch zum Molekulargewicht des als hirngängig beschriebenen A β -Liganden Curcumins ist (Koronyo-Hamaoui et al. 2011). BSc4352 und Curcumin ähneln sich zusätzlich nicht nur mit den experimentell ermittelten LogP-Werten zwischen 1,2 und 1,3 im Grad an Lipophilie, sondern zeigen auch Gemeinsamkeiten in ihrer Fluorochromkinetik wie bspw. in einem nach 15 min p.i. erreichten Höhepunkt der Fluorochromakkumulation in der Kopffregion sowie einer nur geringen Auswaschung der Fluorochrome binnen des 4 h-stündigen (p.i.) Beobachtungszeitraums im *Telecephalon* bzw. Auge. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass für das Fluorochrom BSc4352 von einer ähnlichen Pharmakokinetik im Kopfbereich und damit einer Hirngängigkeit wie bei Curcumin auszugehen ist.

Nach i.n. Applikation konnte BSc4352 weder im Gewebe des Gehirns, noch des Auges fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass BSc4352 nicht über olfaktorische/trigeminale Wege in das Nervengewebe des Gehirns/der Retina transportiert werden kann. Der dennoch *ex vivo* im präparierten *Telencephalon* erfolgte Nachweis von BSc4352 ist wie folgt zu erklären: aufgrund der starken BSc4352-Akkumulation in der Lunge könnte BSc4352 über das respiratorische Epithel in den systemischen Kreislauf gelangt sein und hat vermutlich auf diesem Weg die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Aufgrund der geringen Dosis konnte dies jedoch nicht im Hirn- und Augengewebe histologisch detektiert werden.

In den präparierten Augen und dem Gehirn von mit DY-730 i.v. verabreichten Mäusen konnte im Zeitverlauf von 15 min bis 4 h p.i. ein starker Abfall in der DY-730-Akkumulation beobachtet werden. Damit zeigte DY-730 ein ähnliches Anflutungs- und Auswaschungsverhaltens wie ICG, das sich nach i.v. Applikation nur in Gefäßwänden bewegt (Brown und Strong 1973). Die makroskopische Fluorochromanreicherung von DY-730 im Gehirn zeigte vor allem eine Anfärbung der Gefäße und ähnelte damit der Gefäßdarstellung durch ICG. Da DY-730 auch histologisch im Hirngewebe nicht nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass es nicht hirngängig ist. Zuvor hatte DY-730 *in vitro* gezeigt, dass ein geringerer Anteil dieses Fluorochroms als bei BSc4352 einen Endothelzellmonolayer passieren

konnte. Eine Ursache für das Ausbleiben des Transports über die Blut-Hirn/Retina-Schranke von DY-730 ist in seinem Molekulargewicht zu finden: das NIR-Fluorochrom weist mit 660 g/mol ein etwa doppelt so großes Molekulargewicht wie BSc4352 auf und zeigt damit eine ähnliche Größenordnung wie das nicht hirngängige ICG. Zusätzlich stellen die einfach negative Ladung (Hawkins und Davis 2005) und die deutlich polarere Oberfläche (Kelder et al. 1999) von DY-730 (vgl. BSc4352) limitierende Faktoren für eine Hirngängigkeit dar. Hinzu kommt, dass die über Ultrafiltration ermittelte Affinität zum humanen Serumalbumin, die nicht zuletzt durch den sehr hohen LogP-Wert von DY-730 (vgl. BSc4352) begründet ist, bei DY-730 im Vgl. zu BSc4352 deutlich erhöht war, sodass bei einer i.v. Gabe des NIR-Fluorochroms mit einer mehrheitlichen Bindung von DY-730 an Albumin zu rechnen ist (Keller et al. 2002). Die aus der Albuminbindung resultierende enorme Steigerung des Molekulargewichts von DY-730, welche in der Folge mit der Querschnittsfläche bzw. der Molekülgröße korreliert, macht eine Penetration der festen Zell-Zellverbände der Blut-Hirn-Schranke für DY-730 nach i.v. Applikation unmöglich.

Nach i.n. Applikation konnte eine Akkumulation von DY-730 im *Bulbus olfactorius* und *Telencephalon ex vivo* im Organ als auch histologisch nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein Transport von DY-730 über olfaktorische Transportwege möglich ist. Unter Berücksichtigung des Zeitverlaufs der Anreicherung von DY-730 im *Telencephalon* (Höhepunkt 120 min p.a.) und dem Wissen, dass auch Makromoleküle wie Albumin auf neuronalem Weg das zentrale Nervensystem erreichen können (Moos et al. 1991; Hanson und Frey 2008), könnte für DY-730 ein retrograder axonaler Transport zugrunde liegen.

In der Retina konnte DY-730 nach i.n. Applikation histologisch nicht nachgewiesen werden. Auch wenn dieses Ergebnis darauf hinweist, dass von DY-730 die Retina im vorliegenden Versuch über olfaktorische Wege nicht erreicht werden konnte, könnte ein Nachweis von DY-730 im Auge nach i.n. Applikation möglicherweise mit einer erhöhten Dosis realisiert werden, da die Nase über den *Nervus nasociliaris* des *Nervus ophthalmicus*, einem der drei Hauptäste des *Nervus trigeminus*, mit den Nervenbahnen des Auges verbunden ist (Trepel 2004), was gemeinsam mit dem Wissen über den erfolgreichen DY-730-Transport ins Hirngewebe einen Transport von DY-730 über die Nase zur Retina theoretisch möglich macht.

Die Anreicherung nach i.v. Applikation von BSc4352 und nach i.n. Applikation von DY-730 im Gehirn zeigte sich vor allem in der Großhirnrinde, dem *Cortex cerebri*, im Bereich des Frontal-, Parietal- und Temporallappens. Vor allem Bereiche des Frontal- und Temporallappens sind in präklinischen bzw. eher frühen Alzheimer-Stadien von Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündeln betroffen (Braak und Braak 1991; Serrano-Pozo et al. 2011). Auch wenn eine fluoreszenzbasierte nicht-invasive Bildgebung von Alzheimer im humanen Gehirn mit BSc4352 und DY-730 aufgrund der dicken Schädelkalotte des Menschen nicht realisierbar ist, so macht dieses Ergebnis deutlich, dass BSc4352 aufgrund seiner Hirngängigkeit und DY-730 aufgrund des realisierbaren Transports über olfaktorische Wege für einen Nachweis der Alzheimerläsionen im zentralen Nervensystem grundsätzlich geeignet sind, was wiederum die essentielle Bedeutung der zum Gehirn zugehörigen, aber auf nicht-invasive Weise zugänglichen humanen Retina für eine Alzheimer-Fluoreszenzbildgebung am lebenden Menschen aufzeigt. Da für den Nachweis der Erreichbarkeit des zentralen Nervensystems durch BSc4352 und DY-730 in dieser Arbeit nur gesunde Tiere verwendet wurden, müsste in nachfolgenden Spezifitätsuntersuchungen an AD-Tiermodellen untersucht werden, wie groß der Anteil unspezifisch gebundener Fluorochrommoleküle in den für die AD-Läsionen relevanten Hirn/Retinaarealen im Vgl. zu spezifisch in die Amyloid- und Tau-Fibrillen eingelagerten Fluorochromen ist.

Nach Überschreitung der Blut-Retina-Schranke akkumulierte BSc4352 in der Retina innerhalb der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren und im Bereich des retinalen Pigmentepithels. Eine im Vgl. dazu eher schwächere Anreicherung dieses Fluorochroms war im Übergang der äußeren plexiformen Schicht zur inneren nukleären Schicht sowie der inneren nukleären Schicht zur inneren plexiformen Schicht und leicht außerhalb der Ganglienzellschicht Richtung der Nervenfaserschicht zu verzeichnen. Dies zeigt, dass BSc4352 in der Lage ist, in die für die Alzheimerläsionen relevanten Retinaschichten vorzudringen, da retinale Amyloid-Plaques bereits in der Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht, der inneren und äußeren plexiformen Schicht sowie der inneren nukleären Schicht von transgenen AD-Mausmodellen (Perez et al. 2009; Koronyo-Hamaoui et al. 2011) und neuropathologisches Tau bei humanen AD-Fällen im Bereich der Macula und in der inneren nukleären Schicht, in transgenen AD-Mausmodellen vor allem in der retinalen Ganglienzellschicht und den inneren sowie äußeren plexiformen- und nukleären Schichten

(Liu et al. 2009; Gasparini et al. 2011; Ikram et al. 2012; Schön et al. 2012) nachgewiesen werden konnten. Auch wenn im Gegensatz zu den o.g. Quellen eine Forschergruppe Amyloid-Plaques in der Retina bisher nicht nachweisen konnte (Schön et al. 2012), ist BSc4352 als flexibles Werkzeug für die fluoreszenzbasierte Alzheimerbildgebung der Retina zu werten, da der Einsatz dieses Fluorochroms - unabhängig von der Entwicklung der Datenlage zum Vorkommen retinaler A β -Plaques - aufgrund seiner A β - und Tau-Selektivität (Boländer et al. 2012) nicht nur auf den Nachweis von Amyloid-Plaques beschränkt bleibt, sondern auf den parallelen Nachweis von Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen ausgedehnt oder auch auf die alleinige Bildgebung von Tau ausgebaut werden kann. Sollte der bisher nur durch eine kleine Studie an sechs Alzheimerpatienten ermittelte Hinweis, bei den in den Retinae humaner AD-Patienten detektierten Tau-Ablagerungen handle es sich nicht um fibrilläre Neurofibrillenbündel, sondern nur um hyperphosphoryliertes Tau (Schön et al. 2012), durch weitere Belege als relevant erweisen, so müsste in der Konsequenz für BSc4352 als auch DY-730 nachwirkend untersucht werden, ob zusätzlich zum Nachweis fibrillärer Tau-Strukturen mit den Fluorochromen auch die Detektion der pathologischen Vorstufen der Tau-Fibrillen gelingt.

Zusammenfassend stellt BSc4352 ein vielversprechendes Kontrastmittel dar, das aufgrund seiner Hirngängigkeit und seiner Fähigkeit, in die für die neuropathologischen Ablagerungen relevanten Bereiche der Retina vorzudringen, die Voraussetzungen für den Einsatz in einem nicht-invasivem Scanverfahren des Augenhintergrundes für eine Frühdiagnose von Alzheimer über die optische Detektion von Amyloid-Plaques und/oder Tau-Ablagerungen erfüllt.

Trotz ausbleibender Hirngängigkeit und dem in dieser Arbeit nicht darstellbaren Transport zur Retina nach intranasaler Applikation von DY-730 liefert der auf olfaktorischem Wege erreichte Transport von DY-730 in die für die AD-Neuropathologien relevanten Hirnareale grundsätzlich einen Beleg für das Potential von DY-730, als nicht-invasiv applizierte Sonde Anwendung in einem Fluoreszenzbildgebungsverfahren von AD zu finden. Eine eindeutige Prognose für den Einsatz am humanen AD-Auge kann hierbei jedoch erst nach Findung geeigneter Dosisverabreichungen und erneuter Erprobung der Erreichbarkeit der Retina nach i.n. Applikation getroffen werden.

7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Fluorochrom BSc4352 als erfolgsversprechendster Ligand für ein Frühdiagnoseverfahren von AD identifiziert werden. Dabei war neben der vielversprechenden A β 1-40-Bindungsaffinität und Interkalationsfähigkeit mit fibrillären AD-Strukturen auch die nachgewiesene Hirngängigkeit von BSc4352 entscheidend, wodurch das Vordringen dieses Fluorochroms in die für die neuropathologischen AD-Ablagerungen relevanten Schichten der Retina realisiert werden konnte. Günstige spektrale Eigenschaften für eine gute Diskriminierung der BSc4352-Signale von der Autofluoreszenz des Augenhintergrundes und das Ausbleiben phototoxischer Schäden zeigten letztlich die hervorragende Eignung von BSc4352 für ein am Auge angewendetes optisches Bildgebungsverfahren.

Darüber hinaus wäre durch BSc4352 die Umsetzung eines nicht-invasiven Eingriffes möglich, da aufgrund der guten *in vitro*-Tolerierbarkeit durch humane Zielzellen und der Aktivierung stressrelevanter Schutzmechanismen der Zelle über die Expressionssteigerung von Genen entgiftender und antioxidativ wirkender Enzyme mit einer günstigen *in vivo*-Biokompatibilitätsprognose nach i.v. Applikation von BSc4352 zu rechnen ist. Zusätzlich ist durch eine eher mäßige Lipophilie des Fluorochroms und einer daraus resultierenden geringen Affinität zu humanen Plasmaproteinen eine die Bildgebung beeinflussende limitierte Bioverfügbarkeit dieses A β /Tau-Liganden nicht zu erwarten, sodass eine stark erhöhte Dosisgabe auf Kosten der Biokompatibilität vermieden werden kann.

In der Translation auf eine klinische Anwendung können diese Daten als Ansatz für ein Verfahren gesehen werden, bei dem das Fluorochrom i.v. verabreicht wird und nach der Interkalation mit den neuropathologischen Ablagerungen diese über ein mit konfokaler Bildgebung gekoppeltes Fundusimaging des Auges in der Retina deutlich vor der Manifestation erster AD-Symptome fluoreszenzbildgebend detektieren kann.

Darüber hinaus konnte mit dieser Arbeit durch die breit gefächerten Untersuchungen zur *in vitro*-Biokompatibilität fluoreszenter A β - und Tau-Liganden eine solide Basis an Grundlagenwissen über die Vitalität potentieller AD-Sonden auf relevante Zielzellen, die Relevanz der Molekülstruktur bezüglich des zytotoxischen Potentials der Sonden sowie die an der Auslösung zytotoxischer Effekte beteiligten Mechanismen aufgebaut werden. Besonders vielversprechend ist dabei das Ergebnis, dass Fluorochrome auf der Basis von

Bis(arylvinyl)pyrazinen, Bis(arylvinyl)pyrimidinen und asymmetrischen Hemicyaninen eine deutlich bessere Biokompatibilität zeigten als die A β /Tau-Referenz MeX04 und das unspezifische, aber bereits zugelassene ICG, was das Risiko für langfristige Nebenwirkungen bei einem *in vivo*-Einsatz der neuartigen Fluorochrome minimiert. Das erlangte Wissen, dass vor allem Fluorochrome auf der Basis pyrazinbasierter Bisstilbene durch die Genaktivierung antioxidativ wirkender Enzyme das intrazelluläre ROS-Niveau deutlich besser im Gleichgewicht halten können und daraus resultierend weniger kritische Effekte auf den Metabolismus vitaler Zielzellen induzieren als die ihnen strukturverwandten Pyrimidine, ist für die Entwicklung neuartiger, biokompatibler Sonden von enormer Bedeutung. Ausgehend von den Daten dieser Arbeit, kann für das Sondendesign zukünftiger AD-Liganden weiterhin berücksichtigt werden, dass der Querdurchmesser potentieller Sonden für eine passgenaue Interkalationsfähigkeit der Fluorochrome mit den fibrillären AD-Ablagerungen und letztendlich eine zufriedenstellende Detektierbarkeit von A β - und Tau-Fibrillen entscheidend ist, weswegen die hier vorgestellten Bis(arylvinyl)pyrimidine als Orientierung für die Optimierung targetspezifischer Sonden dienen können.

Im nächsten Schritt der Sondenevaluierung sind in der präklinischen Erprobungsphase von BSc4352 detaillierte Spezifitätsuntersuchungen an AD-Mausmodellen durchzuführen, um den Anteil spezifisch an die AD-Retina gebundener Fluorochrommoleküle zu ermitteln, Unterschiede in der Pharmakokinetik von BSc4352 in an AD erkrankten und gesunden Mäusen zu erfassen und eine Optimierung einer für eine hervorragende Bildgebung retinaler Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen notwendigen Dosis vorzunehmen. Gleichzeitig ist dem Hinweis des Vorkommens von hyperphosphoryliertem Tau in der humanen Retina nachzugehen und das Interkalationsverhalten von BSc4352 dahingehend zu untersuchen. Darüber hinaus sollte unter Verwendung von Mausmodellen nicht-AD-assoziierter fibrillärer Neuropathien die differentialdiagnostische Aussagekraft der BSc4352-basierten optischen Bildgebungsmethode geprüft werden.

Durch die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit kann die fluoreszenzoptische Bildgebung der Retina mit targetaffinen und biokompatiblen Sonden auf der Basis der Bis(arylvinyl)pyrazin-Struktur von BSc4352 als attraktive Möglichkeit zur Früherkennung von *Morbus Alzheimer* eingestuft werden, die sich aufgrund geringer Kosten auch für den Einsatz in der Klinikroutine eignen würde.

8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. 2007. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*, 4(6):807-818.

Annapragada A, Eriksen JL, Tanifum EA, Dasgupta I, Cook SC. 2012. US 2012/0258044 A1: Lipid-based Nanoparticles. U.S.A.

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(3):631-639.

Balaiya S, Brar VS, Murthy RK, Chalam K. 2009. Effects of Indocyanine green on cultured retinal ganglion cells in-vitro. *BMC Res Notes*, 2(236).

Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770):1019-1031.

Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC. 2012. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 367(9):795-804.

Benadiba M, Luurtsema G, Wichert-Ana L, Buchpigel CA, Busatto Filho G. 2012. New molecular targets for PET and SPECT imaging in neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatr*, 34(2):125-136.

Berisha F, Feke GT, Trempe CL, McMeel JW, Schepens CL. 2007. Retinal abnormalities in early Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(5):2285-2289.

Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M, Crowther RA. 2003. Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15):9034-9038.

Bindewald A, Jorzik JJ, Roth F, Holz FG. 2005. [cSLO digital fundus autofluorescence imaging]. *Ophthalmologie*, 102(3):259-264.

Birks J. 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, (1):CD005593.

Boländer A, Kieser D, Voss C, Bauer S, Schon C, Burgold S, Bittner T, Hölzer J, Heyny-von Haussen R, Mall G, Goetschy V, Czech C, Knust H, Berger R, Herms J, Hilger I, Schmidt B. 2012. Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines, and -pyridazines as imaging agents for tau fibrils and beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease models. *J Med Chem*, 55(21):9170-9180.

Boländer A, Kieser D, Voss C, Bauer S, Schön C, Burgold S, Bittner T, Hölzer J, Heyny-von Haussen R, Mall G, Goetschy V, Czech C, Knust H, Berger R, Herms J, Hilger I, Schmidt B. 2012. Bis(arylvinyl)pyrazines, -pyrimidines, and -pyridazines As Imaging Agents for Tau Fibrils and beta-Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Models. *J Med Chem*, 55(21):9170-9180.

Bong P-H. 2000. Spectral and Photophysical Behaviors of Curcumin and Curcuminoids. *Bull Korean Chem So*, 21(1):81-86.

Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, 112(4):389-404.

Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4):239-259.

Brown N, Strong R. 1973. Infrared fundus angiography. *Br J Ophthalmol*, 57(10):797-802.

Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C. 1992. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem*, 267(1):546-554.

Caesar J, Shaldon S, Chiandussi L, Guevara L, Sherlock S. 1961. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin Sci*, 21:43-57.

Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. 1960. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest*, 39:592-600.

Chu LW. 2012. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med J*, 18(3):228-237.

Clark DE. 2011. What has polar surface area ever done for drug discovery? *Future Med Chem*, 3(4):469-484.

Creuzot-Garcher C, Acar N, Passemard M, Bidot S, Bron A, Bretillon L. 2010. Functional and structural effect of intravitreal indocyanine green, triamcinolone acetonide, trypan blue, and brilliant blue g on rat retina. *Retina*, 30(8):1294-1301.

Czerney P, Lehmann F, Schweder B, Wenzel M. 2004. US 6750346 B2: Stable near-infrared (NIR) marker dyes based on benzopyrelum-polymethins. Deutschland.

Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. 2012. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis*, 3:e338.

Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL, Ng CS, Badmaev V, Kurzrock R. 2008. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 14(14):4491-4499.

Dobosz M, Scheuer W, Strobel S. 2011. WO 2011/012646 A2: Non-invasive in vivo optical imaging method. Deutschland.

Drugsite-Trust. 2012. Indocyanine Green. Abgerufen am 18.07.2013 auf <http://www.drugs.com/pro/indocyanine-green.html>.

Ejstrup R, la Cour M, Heegaard S, Kiilgaard JF. 2012. Toxicity profiles of subretinal indocyanine green, Brilliant Blue G, and triamcinolone acetonide: a comparative study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 250(5):669-677.

Fjell AM, Walhovd KB, Fennema-Notestine C, McEvoy LK, Hagler DJ, Holland D, Brewer JB, Dale AM. 2010. CSF biomarkers in prediction of cerebral and clinical change in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 30(6):2088-2101.

Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, McLean CA, Cao D, Rigopoulos A, Cartwright GA, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Barnham KJ, Rowe CC, Masters CL, Kudo Y, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL. 2011. 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain*, 134(Pt 4):1089-1100.

Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. 1975. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12(3):189-198.

Gasparini L, Crowther RA, Martin KR, Berg N, Coleman M, Goedert M, Spillantini MG. 2011. Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: effects on axonal viability. *Neurobiol Aging*, 32(3):419-433.

Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR. 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60(9):1495-1500.

Gilbert BJ. 2013. The role of amyloid beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Clin Pathol*, 66(5):362-366.

Goldstein LE, Muffat JA, Cherny RA, Moir RD, Ericsson MH, Huang X, Mavros C, Coccia JA, Faget KY, Fitch KA, Masters CL, Tanzi RE, Chylack LT, Jr., Bush AI. 2003. Cytosolic beta-amyloid deposition and supranuclear cataracts in lenses from people with Alzheimer's disease. *Lancet*, 361(9365):1258-1265.

Groenning M, Olsen L, van de Weert M, Flink JM, Frokjaer S, Jorgensen FS. 2007. Study on the binding of Thioflavin T to beta-sheet-rich and non-beta-sheet cavities. *J Struct Biol*, 158(3):358-369.

Halliwel B, Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 57(5):715-724.

Hamann FM, Brehm R, Pauli J, Grabolle M, Frank W, Kaiser WA, Fischer D, Resch-Genger U, Hilger I. 2011. Controlled modulation of serum protein binding and biodistribution of asymmetric cyanine dyes by variation of the number of sulfonate groups. *Mol Imaging*, 10(4):258-269.

Hammer M. 2013. Persönliche Mitteilung (interner Schlussbericht im BMBF-Projektvorhaben MINDE). Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Klinik für Augenheilkunde, Experimentelle Ophthalmologie, Bachstraße 18, 07740 Jena.

Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE. 2008. Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging*, 3(2):211-225.

Hanson LR, Frey WH, 2nd. 2008. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci*, 9(Suppl 3):5.

Hardy J, Selkoe DJ. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353-356.

Hassenstein A, Meyer CH. 2009. Clinical use and research applications of Heidelberg retinal angiography and spectral-domain optical coherence tomography - a review. *Clin Experiment Ophthalmol*, 37(1):130-143.

Hawkins BT, Davis TP. 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 57(2):173-185.

Hayes JD, Pulford DJ. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(6):445-600.

Hayes JD, Strange RC. 1995. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res*, 22(3):193-207.

Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Sato K, Sasamoto K, Saido TC. 2005. 19F and 1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo. *Nat Neurosci*, 8(4):527-533.

Hussey AJ, Hayes JD. 1992. Characterization of a human class-Theta glutathione S-transferase with activity towards 1-menaphthyl sulphate. *Biochem J*, 286(3):929-935.

Hyman BT, Marzloff K, Arriagada PV. 1993. The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution. *J Neuropathol Exp Neurol*, 52(6):594-600.

Ikram MK, Cheung CY, Wong TY, Chen CP. 2012. Retinal pathology as biomarker for cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(9):917-922.

Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC. 2004. Early A β accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, 62(6):925-931.

Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. 2005. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1739(2-3):198-210.

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

Jimenez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson CV, Dobson CM, Saibil HR. 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14):9196-9201.

Johnson KA, Fox NC, Sperling RA, Klunk WE. 2012. Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(4):a006213.

Joseph P, Jaiswal AK. 1994. NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(18):8413-8417.

Joseph PD. 2010. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics*, 2010:876940.

Kelder J, Grootenhuis PD, Bayada DM, Delbressine LP, Ploemen JP. 1999. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm Res*, 16(10):1514-1519.

Keller E, Ishihara H, Nadler A, Niederer P, Seifert B, Yonekawa Y, Frei K. 2002. Evaluation of brain toxicity following near infrared light exposure after indocyanine green dye injection. *J Neurosci Methods*, 117(1):23-31.

Kemppainen NM, Aalto S, Wilson IA, Nagren K, Helin S, Bruck A, Oikonen V, Kailajarvi M, Scheinin M, Viitanen M, Parkkola R, Rinne JO. 2007. PET amyloid ligand [¹¹C]PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. *Neurology*, 68(19):1603-1606.

Ketterer B. 1998. Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radic Res*, 28(6):647-658.

Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Debnath ML, Holt DP, Wang Y, Hyman BT. 2002. Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(9):797-805.

Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*, 55(3):306-319.

Kobayashi M, Yamamoto M. 2005. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, 7(3-4):385-394.

Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov AV, Miller CA, Ko MK, Black KL, Schwartz M, Farkas DL. 2011. Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *Neuroimage*, 54 Suppl 1:204-217.

Koronyo Y, Salumbides BC, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. 2012. Alzheimer's disease in the retina: imaging retinal abeta plaques for early diagnosis and therapy assessment. *Neurodegener Dis*, 10(1-4):285-293.

Krebs MR, Bromley EH, Donald AM. 2005. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol*, 149(1):30-37.

Krokan HE, Bjoras M. 2013. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4):a012583.

Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT, Jr. 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418(6895):291.

Lazo ND, Downing DT. 1998. Amyloid fibrils may be assembled from beta-helical protofibrils. *Biochemistry*, 37(7):1731-1735.

Lerman S. 1987. Chemical and physical properties of the normal and aging lens: spectroscopic (UV, fluorescence, phosphorescence, and NMR) analyses. *Am J Optom Physiol Opt*, 64(1):11-22.

Lilly USA. 2012. FDA Approves Amyvid™ (Florbetapir F 18 Injection) for Use in Patients Being Evaluated for Alzheimer's Disease and Other Causes of Cognitive Decline. Abgerufen am 16.08.2013 auf <https://investor.lilly.com/releasedetail2.cfm?ReleaseID=662647>.

Liu B, Rasool S, Yang Z, Glabe CG, Schreiber SS, Ge J, Tan Z. 2009. Amyloid-peptide vaccinations reduce beta-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *Am J Pathol*, 175(5):2099-2110.

Liu F, Du ZY, He JL, Liu XQ, Yu QB, Wang YX. 2012. FTH1 binds to Daxx and inhibits Daxx-mediated cell apoptosis. *Mol Biol Rep*, 39(2):873-879.

Lockhart A, Ye L, Judd DB, Merritt AT, Lowe PN, Morgenstern JL, Hong G, Gee AD, Brown J. 2005. Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem*, 280(9):7677-7684.

Lomakin A, Chung DS, Benedek GB, Kirschner DA, Teplow DB. 1996. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(3):1125-1129.

Luurtsema G, Schuit RC, Takkenkamp K, Lubberink M, Hendrikse NH, Windhorst AD, Molthoff CF, Tolboom N, van Berckel BN, Lammertsma AA. 2008. Peripheral metabolism of [(18)F]FDDNP and cerebral uptake of its labelled metabolites. *Nucl Med Biol*, 35(8):869-874.

Mac M, Nalecz KA. 2003. Expression of monocarboxylic acid transporters (MCT) in brain cells. Implication for branched chain alpha-ketoacids transport in neurons. *Neurochem Int*, 43(4-5):305-309.

Malinchik SB, Inouye H, Szumowski KE, Kirschner DA. 1998. Structural analysis of Alzheimer's beta(1-40) amyloid: protofilament assembly of tubular fibrils. *Biophys J*, 74(1):537-545.

Matsui H, Karasawa Y, Sato T, Kanno S, Nishikawa S, Okisaka S. 2007. [Toxicity of indocyanine green dye on Muller cells]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*, 111(8):587-593.

Micheau O, Shirley S, Dufour F. 2013. Death receptors as targets in cancer. *Br J Pharmacol*, 169(8):1723-1744.

Moos T, Stagaard M, Mollgard K. 1991. Immunocytochemical evidence for retrograde axonal transport of exogenous albumin in adult rat brain stem motor neurons. *Neurosci Lett*, 127(1):1-4.

Müller MJ. 2007. Ernährungsmedizinische Praxis: Methoden - Prävention - Behandlung. Kiel: Springer.

Narlawar R, Pickhardt M, Leuchtenberger S, Baumann K, Krause S, Dyrks T, Weggen S, Mandelkow E, Schmidt B. 2008. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem*, 3(1):165-172.

Ohtsuki S. 2004. Physiological function of blood-brain barrier transporters as the CNS supporting and protecting system. *Yakugaku Zasshi*, 124(11):791-802.

Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yoshikawa T, Harada R, Ito S, Fujikawa Y, Arai H, Yanai K, Kudo Y. 2011. In vivo detection of amyloid plaques in the mouse brain using the near-infrared fluorescence probe THK-265. *J Alzheimers Dis*, 23(1):37-48.

Ott P. 1998. Hepatic elimination of indocyanine green with special reference to distribution kinetics and the influence of plasma protein binding. *Pharmacol Toxicol*, 83 Suppl 2:1-48.

Pardridge WM. 2003. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv*, 3(2):90-105.

Pardridge WM. 2005. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol*, 30(1):57-70.

Pauli J, Vag T, Haag R, Spieles M, Wenzel M, Kaiser WA, Resch-Genger U, Hilger I. 2009. An in vitro characterization study of new near infrared dyes for molecular imaging. *Eur J Med Chem*, 44(9):3496-3503.

Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. 2006. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112):700-704.

Perez SE, Lumayag S, Kovacs B, Mufson EJ, Xu S. 2009. Beta-amyloid deposition and functional impairment in the retina of the APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(2):793-800.

Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum*, 10(1):92-95.

Pilotto E, Sportiello P, Alemany-Rubio E, Vujosevic S, Segalina S, Fregona I, Midena E. 2013. Confocal scanning laser ophthalmoscope in the retromode imaging modality in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 251(1):27-34.

Prabhu KS, Reddy PV, Jones EC, Liken AD, Reddy CC. 2004. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 424(1):72-80.

Prince M, Jackson J, Hrsg. 2009. World Alzheimer Report 2009. London: Alzheimer's Disease International.

Prohaska JR. 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta*, 611(1):87-98.

PULSION. 2012. ICG-PULSION-Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung Abgerufen am 19.09.2013 auf <http://www.pharmazie.com/graphic/A/49/1-25749.pdf>.

Ran C, Xu X, Raymond SB, Ferrara BJ, Neal K, Bacskai BJ, Medarova Z, Moore A. 2009. Design, synthesis, and testing of difluoroboron-derivatized curcumins as near-infrared probes for in vivo detection of amyloid-beta deposits. *J Am Chem Soc*, 131(42):15257-15261.

Rapoport SI. 2000. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol*, 20(2):217-230.

Sadowski M, Pankiewicz J, Scholtzova H, Tsai J, Li Y, Carp RI, Meeker HC, Gambetti P, Debnath M, Mathis CA, Shao L, Gan WB, Klunk WE, Wisniewski T. 2004. Targeting prion amyloid deposits in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(7):775-784.

Scheinin NM, Aalto S, Koikkalainen J, Lotjonen J, Karrasch M, Kemppainen N, Viitanen M, Nagren K, Helin S, Scheinin M, Rinne JO. 2009. Follow-up of [11C]PIB uptake and brain volume in patients with Alzheimer disease and controls. *Neurology*, 73(15):1186-1192.

Schön C, Hoffmann NA, Ochs SM, Burgold S, Filser S, Steinbach S, Seeliger MW, Arzberger T, Goedert M, Kretzschmar HA, Schmidt B, Herms J. 2012. Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS One*, 7(12):e53547.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1):a006189.

Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gomez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. 2011. Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 179(3):1373-1384.

Shepro D, Morel NM. 1993. Pericyte physiology. *FASEB J*, 7(11):1031-1038.

Small GW, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, Bookheimer SY, Miller KJ, Lavretsky H, Burggren AC, Cole GM, Vinters HV, Thompson PM, Huang SC, Satyamurthy N, Phelps ME, Barrio JR. 2006. PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med*, 355(25):2652-2663.

Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, Hyman BT. 2009. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci*, 32(3):150-159.

Stiller D, Katenkamp D, Thoss K. 1972. Staining mechanism of thioflavin T with special reference to the localization of amyloid. *Acta Histochem*, 42(2):234-245.

Takacsne NK. 1998. Computerized logP prediction using fragment methods. *Acta Pharm Hung*, 68(1):39-48.

Talegaonkar S, Mishra PR. 2004. Intranasal delivery: An approach to bypass the blood brain barrier. *Indian Journal of Pharmacology*, 36(3):140-147.

Trepel M. 2004. *Neuroanatomie. Struktur und Funktion*. München: Urban & Fischer.

Wadsworth RM. 2008. Oxidative stress and the endothelium. *Exp Physiol*, 93(1):155-157.

Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler TW, Talalay P. 2004. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7):2040-2045.

Warburton S, Davis WE, Southwick K, Xin H, Woolley AT, Burton GF, Thulin CD. 2007. Proteomic and phototoxic characterization of melanolipofuscin: correlation to disease and model for its origin. *Mol Vis*, 13:318-329.

Webb RH, Hughes GW, Delori FC. 1987. Confocal scanning laser ophthalmoscope. *Appl Opt*, 26(8):1492-1499.

Wegener AR. 1994. In vivo studies on the effect of UV-radiation on the eye lens in animals. *Doc Ophthalmol*, 88(3-4):221-232.

Weissleder R, Mahmood U. 2001. Molecular imaging. *Radiology*, 219(2):316-333.

Wheeler HO, Cranston WI, Meltzer JL. 1958. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. *Proc Soc Exp Biol Med*, 99(1):11-14.

Wiberg H, Ek P, Pettersson FE, Lannfelt L, Emmer A, Roeraade J. 2010. Separation and characterization of aggregated species of amyloid-beta peptides. *Anal Bioanal Chem*, 397(6):2357-2366.

Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, Xu XH, Xiao ZC, Tan EK. 2011. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr*, 5(4):280-292.

9 ANHANG

9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Frau Prof. Dr. Hilger unterstützte mich bei der Sichtung und Auswahl des Datenmaterials und der Überarbeitung des Manuskripts
- Dr. Heyny-von Haußen organisierte die Beschaffung und Anfertigung der humanen Gehirnschnitte von Alzheimerpatienten
- Dr. Alexander Boländer, Dr. Daniel Kieser und Dr. Frank Lehmann unterstützten mich bei den Vorüberlegungen zur initialen Auswahl der Fluorochrome

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift

9.2 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Prof. Ingrid Hilger für die Überlassung dieses hochaktuellen, praxisnahen Themas und die zahlreichen, produktiven Diskussionen, die mir stets ein besonderer Ansporn waren und zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Für die Möglichkeit, als Mitarbeiter am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Jena mitzuwirken, bedanke ich mich bei Prof. Werner A. Kaiser.

Frau Prof. Dagmar Fischer danke ich für die Vertretung an der biologisch-pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Projektpartnern des Verbundprojektes MINDE für die konstruktive Zusammenarbeit. Hierbei sei vor allem Christiane Kuhne gedankt für ihre schnellen Hilfestellungen in organisatischen Belangen. Bei Prof. Boris Schmidt, Dr. Daniel Kieser und Dr. Alexander Boländer sowie Dr. Peter Czerney und Dr. Frank Lehmann bedanke ich mich für die Bereitstellung der Fluorochrome und die geduldige Beantwortung chemisch orientierter Fragestellungen. Darüber hinaus danke ich Dr. Roland Heyny-von Haußen für die Bereitstellung der humanen Hirnpräparate und die hilfreichen Hinweise zur Durchführung histologischer Färbungen.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe der Experimentellen Radiologie bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft sowie die produktiven Diskussionsrunden und erheiternden Gespräche im Labor und auch darüber hinaus. Im Speziellen bedanke ich mich bei Julia Göring für die unkomplizierte Hilfe, vor allem bei der Durchführung zahlreicher Zytotoxizitätstests - danke Jule, du warst spitze! Bei Brigitte Grobis bedanke ich mich für die Geduld bei der Erfüllung jeglicher organisatorischer Wünsche meinerseits. Susanne Kossatz und Katja Szameit danke ich für die tolle Zeit in unserer Büro-Oase.

Bei meinen Freunden und meiner Familie bedanke ich mich für das Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und die gelungenen Ablenkungsmanöver in meiner Freizeit.

Ganz besonders danke ich Karsten für all die Geduld mit mir, das Verständnis in arbeitsintensiven Phasen und den grenzenlosen Rückhalt. Danke!