

Aus der Abteilung Psychiatrie und Psychotherapie
(Prof. Dr. med. P. Falkai)
im Zentrum Psychosoziale Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Neuropathologische und verhaltensbiologische Untersuchungen
an transgenen Alzheimer-Mausmodellen
bezüglich des Angstverhaltens**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annika Dins

aus

Braunschweig

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. T. Bayer

II. Berichterstatter/in: PD Dr. med. J. Weishaupt

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung in die Alzheimer-Krankheit.....	1
1.1.1	Definition und Erstbeschreibung.....	1
1.1.2	Epidemiologie und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit.....	2
1.1.3	Symptomatik der Alzheimer-Krankheit.....	4
1.1.4	Diagnostik der Alzheimer-Krankheit.....	5
1.1.5	Therapie der Alzheimer-Krankheit.....	7
1.2	Neuropathologie und molekulare Genese des M. Alzheimer.....	9
1.2.1	Neurofibrilläre Tangles.....	9
1.2.2	Amyloid- β -Plaques.....	9
1.2.3	Das Amyloid-Vorläufer-Protein (Funktion und Prozessierung).....	10
1.3	Angst in der Alzheimer-Krankheit.....	13
1.3.1	Physiologie der Angst.....	13
1.3.2	Angstverhalten bei Alzheimer-Patienten.....	15
1.3.3	Angstverhalten bei AD-transgenen Mäusen.....	15
1.4	Verwendete transgene Mausmodelle.....	16
1.4.1	APP/PS1KI.....	16
1.4.2	5xFAD.....	17
1.4.3	3xTg.....	18
1.5	Zielsetzung.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Transgene Mäuse.....	21
2.2	Perfusion der Mäuse.....	21
2.3	Einbettung in Paraffin.....	22
2.4	Arbeit am Mikrotom.....	22
2.5	Immunhistochemische Färbung.....	22
2.5.1	Prinzipien.....	22
2.5.2	ABC-Methode.....	23
2.5.3	DAB-Immunohistochemische Färbung.....	23
2.5.4	Fluoreszenz-Doppelfärbung.....	24
2.5.5	Verwendete Antikörper und ihre Epitope.....	26
2.6	Synapsenquantifizierung.....	27
2.7	Plaque-Load.....	27
2.8	Verhaltensbiologische Versuche.....	28

2.8.1	Elevated Plus Maze.....	28
2.8.2	Open Field Test.....	29
2.9	Statistische Analysen.....	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Verhaltensversuche	31
3.1.1	Elevated Plus Maze Test.....	31
3.1.2	Open Field Test	32
3.2	Immunhistochemie.....	33
3.2.1	Untersuchungen der APP/PS1KI-Mäuse	33
3.2.1.1	APP-Expression.....	33
3.2.1.2	A β -Akkumulation.....	34
3.2.1.3	Axonale Degeneration.....	35
3.2.2	Untersuchungen der 5xFAD-Mäuse.....	36
3.2.2.1	APP-Expression.....	36
3.2.2.2	A β -Akkumulation.....	37
3.2.2.3	Axonale Degeneration.....	38
3.2.3	Untersuchungen der 3xTg-Mäuse.....	39
3.2.3.1	APP-Expression.....	39
3.2.3.2	A β -Akkumulation	40
3.2.3.3	Axonale Degeneration.....	40
3.2.3.4	Neurofibrilläre Ablagerungen.....	41
3.2.4	Testung des 6E10-Antikörpers.....	41
3.2.4.1	DAB-Färbung	42
3.2.4.2	Doppel-Fluoreszenzfärbung.....	44
3.3	Quantitative A β -Plaque-Auswertung.....	45
3.3.1	APP/PS1KI-Mäuse.....	45
3.3.2	5xFAD-Mäuse.....	46
3.4	Synapsenquantifizierung.....	46
4	Diskussion.....	48
5	Zusammenfassung.....	54
6	Abbildungsverzeichnis.....	68
7	Tabellenverzeichnis.....	69
8	Anhang.....	70
8.1	Mini-Mental-Status-Test.....	70
8.2	Neuropsychologisches Inventar (Auszüge).....	72
8.3	Gyrus dentatus, gefärbt mit A β (N), 6E10, 23850.....	74

Abkürzungsverzeichnis

A β	A beta
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimer-Demenz
AICD	APP intracellular domain
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APH-1	Anterior pharynx-defective 1
APLP	Amyloid precursor-like-protein
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
BACE1	Beta-site APP-cleaving enzyme 1
BEHAVE-AD	Behavioral pathology in Alzheimer's Disease
CA1-4	Cornu ammonis
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DSM-IV	Diagnostic and statistic manual of mental disorders IV
FAD	Familial Alzheimer Disease
FCS	Fetal cow serum
ICD	International Classification of Disease
KHK	Koronare Herz-Krankheit
M.	Morbus
MCI	Mild Cognitive Impairment
MMST	Mini Mental Status Test
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPI	Neuropsychologisches Inventar
PBS	Phosphate buffered saline
PEN-2	Presenilin enhancer 2
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PS-1	Präsenilin-1
PS-2	Präsenilin-2
Vit.	Vitamin

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Alzheimer-Krankheit

1.1.1 Definition und Erstbeschreibung

Die Alzheimer-Krankheit ist eine Form der primären, degenerativen Demenz (Förstl 2000).

Die Demenz als solche ist wie folgend nach ICD-10 definiert: „Demenz ist ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen. Das Bewusstsein ist nicht getrübt. Die kognitiven Beeinträchtigungen werden gewöhnlich von Veränderungen der emotionalen Kontrolle, des Sozialverhaltens oder der Motivation begleitet, gelegentlich treten diese auch eher auf. Dieses Syndrom kommt bei Alzheimer-Krankheit, bei zerebrovaskulären Störungen und bei anderen Zustandsbildern vor, die primär oder sekundär das Gehirn betreffen.“ (ICD-10 2009).

Demenzen werden also in primäre und sekundäre Formen unterteilt. Zu den primären Formen gehören die degenerativen Formen, zu der auch die Alzheimer-Demenz gehört. Weitere primäre Formen der Demenz sind: Pick-Krankheit/Frontotemporale Degeneration, Demenz mit Lewy-Körperchen (Krämer und Förstl 2008). Zu den sekundären Demenzen gehören beispielsweise die Demenz durch Vitamin-B12-Mangel, Alkoholismus, Infektionskrankheiten wie AIDS oder Creutzfeld-Jakob-Krankheit (Wallesch und Förstl 2005).

Die Demenz bei Alzheimer-Krankheit ist „eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich meist stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren.“ (ICD-10 2009).

1906 beschrieb Alois Alzheimer zum ersten Mal in seiner Publikation „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ eine 51-jährige Patientin, Auguste D., die die typischen Symptome der Alzheimerschen Erkrankung zeigte. Die Patientin hatte sich in ihrem Wesen stark verändert. Sie zeigte emotionale Instabilität, hatte Probleme, ihren Alltag im Haushalt zu bewältigen und hatte Verfolgungsängste. Außerdem war sie zeitlich und örtlich desorientiert. Alzheimer nannte die Krankheit

zunächst „die Krankheit des Vergessens“. Nach dem Tod der Patientin untersuchte Alois Alzheimer das Gehirn der Verstorbenen und stellte Veränderungen fest, die heute zu den neuropathologischen Hauptmerkmalen der Alzheimer-Krankheit zählen: Veränderte, dicke Neurofibrillen (heute neurofibrilläre Tangles), Nervenzellverlust und im Cortex verteilte „Herdchen“ (heute Plaques) (Alzheimer 1907). Man unterscheidet heute zwei verschiedene Formen der Alzheimer-Demenz: So gibt es familiäre, autosomal dominant vererbte Formen (FAD), die vorwiegend in jüngerem Lebensalter auftreten und die Sporadische Alzheimer-Demenz, die mehr als 90% der Alzheimer-Fälle ausmacht (Blennow et al. 2006). Die Prävalenz der FAD liegt zwischen 0-1%, ist also sehr gering (Harvey et al. 2003). Dabei unterscheiden sie sich nur in der Ursache der Erkrankung, das Erscheinungsbild mit den typischen Symptomen ist nicht zu unterscheiden (Selkoe 2001).

1.1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Demenz ist die häufigste Form der Demenz, sie ist für 50-60% aller Demenzfälle verantwortlich. Dabei zeigt sich ein nahezu exponentieller Anstieg mit dem Alter: Nur 1% der 60-64-Jährigen, aber schon 24-33% der Über-85-Jährigen sind von der Alzheimer-Krankheit in den Industrienationen betroffen. Im Jahr 2001 litten mehr als 24 Millionen Menschen an einer Demenz, erwartet wird eine Verdopplung der Zahl alle 20 Jahre, sodass man mit 81 Millionen Demenzkranken 2040 rechnet, da die Lebenserwartung der Menschen kontinuierlich ansteigt (Ferri et al. 2005). Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer Demenz werden multiple Faktoren angesehen:

Der wichtigste Risikofaktor ist das Alter; wie oben erwähnt, ist das Risiko, eine Alzheimer-Demenz zu entwickeln, mit höherem Alter ansteigend. Es können allerdings auch eine verminderte Reservekapazität des Gehirns, eine reduzierte Gehirngröße, geringer Bildungsstand und geringe mentale und physische Aktivität im Alter als Risikofaktoren angesehen werden (Mayeux 2003, Mortimer et al. 2003).

Weitere Studien haben Kopfverletzungen als einen Risikofaktor identifiziert (Jellinger 2004). Auch vaskuläre Erkrankungen, wie Hypercholesterolämie, Bluthochdruck, Arteriosklerose, KHK, Rauchen, Übergewicht und Diabetes sind in der Diskussion, Demenzen mit auslösen zu können (Mayeux 2003). Zur Prävention der Demenz gibt es ebenfalls Studien, diese empfehlen Einnahme von Vitamin B12,

Folsäure, Vitamin C und E und von ungesättigten Fettsäuren (Blennow et al. 2006). Des Weiteren sind von besonderer Bedeutung die genetischen Risikofaktoren, die bei der familiären Form der Alzheimer-Krankheit eine große Rolle spielen.

Die familiäre Alzheimer-Demenz ist eine autosomal dominante Form der Krankheit mit Beginn vor dem Alter von 65 Jahren. Vier Gene sind bekannt, die für die Entstehung der FAD eine Rolle spielen. Diese werden im Folgenden näher erläutert:

So gibt es Mutationen im Gen für das Amyloid Vorläufer-Protein (APP) (Goate et al. 1991). Diese sind direkt vor der β -Sekretase-Schnittstelle, direkt nach der α -Sekretase-Stelle oder in der Nähe der γ -Sekretase-Stelle lokalisiert. Somit kann man folgern, dass die APP-Mutationen zu veränderter Prozessierung des APP führen (Selkoe 2001). Da dieses Gen auf dem Chromosom 21 liegt, kommt es bei Patienten mit Trisomie 21 (Down-Syndrom) häufig zu einer Demenz (Selkoe 2001).

Die meisten Fälle der FAD werden jedoch durch Mutationen in den Präsenilin-Genen ausgelöst. So liegt das Gen für Präsenilin 1 auf dem Chromosom 14 (Sherrington et al. 1995). Bei Familien, in denen Alzheimer mit 40-50 Jahren auftrat, wurden auf diesem Chromosom Missense-Mutationen gefunden. Auf dem Chromosom 1 liegt das Gen für Präsenilin 2, auch hier wurden Mutationen gefunden, die mit der FAD in Verbindung stehen (Levy-Lahad et al. 1995).

Die Mutationen im Gen für Präsenilin 1 verursachen die aggressivste Form des M. Alzheimer, da es zu einem Beginn der Symptomatik schon ab einem Alter von 40 Jahren kommt (Selkoe 2001).

Ein weiterer Faktor, der mit der Entstehung des spät auftretenden Alzheimers diskutiert wird, ist das ApoE4-Allel (Strittmatter et al. 1993).

Apolipoprotein E ist ein Cholesterin-Transporter im Gehirn, wobei das Allel E4 weniger effizient im Recyclen von Membranlipiden und neuronaler Reparatur ist (Poirier 1994). Außerdem ist ApoE auch mit verantwortlich für die A β -Ablagerungen, da es die Fibrillisation und Plaque-Bildung fördert (Holtzman et al. 1997).

Dabei konnte gezeigt werden, dass das E4-Allel des Apolipoproteins E in Alzheimer-Patienten überrepräsentiert ist, wenn man die Häufigkeit des Allels mit der Normalbevölkerung vergleicht (Saunders et al. 1993). Außerdem zeigten Metaanalysen, dass die Anwesenheit des ApoE4-Allels in heterozygoter Form das

Risiko, Alzheimer zu entwickeln, um das Dreifache steigert und in homozygoter Form sogar um das 15fache (Farrer et al. 1997).

Dennoch kann man aus diesen Studien nur schließen, dass das ApoE4-Allel ein Risikofaktor, jedoch keine direkte Ursache für die Alzheimer-Krankheit ist (Selkoe 2001).

1.1.3 Symptomatik der Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Demenz ist eine langsam progrediente Erkrankung des Zentralen Nervensystems. Bei der Symptomatik wird zwischen drei Stadien der Erkrankung unterschieden: Es gibt ein leichtes, ein mittelschweres und ein schweres Stadium (Förstl 2000).

Im leichten Stadium kommt es zu intellektuellen Defiziten, während motorische, koordinatorische und Sinnesfunktionen noch intakt sind (Wallesch und Förstl 2005). Allerdings kann es unter Umständen schon früh zum Ausfall des Geruchsinns kommen (Peters et al. 2003). Die körperliche Leistungsfähigkeit sowie die Kontrolle über Körperausscheidungen bleibt bis ins mittelschwere Stadium bestehen (Wallesch und Förstl 2005).

Im mittelschweren Stadium, das etwa 3 Jahre nach Diagnosestellung eintritt, kommt es zu weiteren Defiziten. So ist in diesem Stadium auch das Neugedächtnis geschädigt, es kommt zu Störungen des logischen Denkens, Planens und Handelns. Außerdem kommt es zu Wortfindungsstörungen und Paraphrasien. Die Fähigkeit, komplexere Handlungsabläufe durchzuführen, wie z.B. das Anziehen, geht verloren, sodass die Selbstständigkeit immer weiter eingeschränkt ist. Bei ca. 20% der Patienten kommt es in diesem Stadium auch zu optischen Halluzinationen, die die emotionale Stabilität ebenfalls gefährden können. Es kann zu verbalen, aber auch physischen Aggressionsausbrüchen kommen (Förstl 2000).

Nach ungefähr weiteren drei Jahren ist das schwere Stadium der Erkrankung erreicht. Die Sprache ist auf simple Phrasen und einfache Wörter reduziert. Auffällig ist außerdem die gestörte circadiane Rhythmik, sodass kein strukturierter Tagesablauf mehr möglich ist. So benötigen die Patienten nun bei vielen alltäglichen Dingen (z.B. beim Essen und Waschen) Hilfe, weil dies allein nicht mehr bewältigt werden kann. Auch Handlungsabläufe, die im impliziten Gedächtnis gespeichert sind, können nicht mehr abgerufen werden. Außerdem kann es zu neurologischen Störungen kommen. Diese zeigen sich in Myoklonien,

parkinsonoidem Rigor oder epileptischen Anfällen (Förstl 2000). Im Endstadium der Erkrankung besteht eine Bettlägerigkeit und die Patienten sind extrem abgemagert, auch durch die mangelnde Ernährung.

Todesursachen sind meist Pneumonien oder aufsteigende Harnwegsinfekte, aber auch kardiovaskuläre Ereignisse wie z.B. Myokardinfarkte (Wallesch und Förstl 2005).

Es wurde allerdings festgestellt, dass die ersten neurodegenerativen Prozesse schon 20-30 Jahre vor den ersten Symptomen beginnen (Davies et al. 1988). Die Phase der ersten Symptome wird MCI genannt. MCI steht dabei für Mild Cognitive Impairment. Dies bezeichnet eine kognitive Störung, die vor allem mit Problemen im Bereich des Kurzzeitgedächtnisses, der Auffassung und Aufmerksamkeit verbunden ist. 10-15% aller Über-65-Jährigen sind von einer MCI betroffen, dabei besteht ein Risiko von ca. 50%, im weiteren Verlauf eine Demenz zu entwickeln (Förstl 2000).

1.1.4 Diagnostik der Alzheimer-Krankheit

Die Diagnose Alzheimer kann definitiv erst post mortem, durch neuropathologische Untersuchung des Gehirns gestellt werden (Wallesch und Förstl 2005). So kann bei Patienten nur die Diagnose „wahrscheinliche Alzheimer-Demenz“ gestellt werden. Dabei gibt es mehrere diagnostische Verfahren, deren Ergebnisse alle zusammen genommen die Wahrscheinlichkeit erhöhen, die richtige Diagnose zu stellen.

Die Hauptfaktoren in der frühen Diagnostik sind die Anamnese, eine psychiatrisch-psychologische Untersuchung, eine neurologische Untersuchung, eine kontrastmittelfreie Computertomographie-Untersuchung und eine Laboruntersuchung. Dabei wird versucht, andere Demenzen auszuschließen und das typische Profil der Erkrankung herauszufiltern.

Da das Krankheitserkennen oft bei den Patienten nicht ausgeprägt ist, ist die Fremdanamnese von großer Bedeutung (Wallesch und Förstl 2005).

Die Diagnosestellung erfolgt nach den Kriterien der International Classification of Diseases (ICD-10 2009) bzw. des Diagnostic and Statistic Manuals (DSM-IVTR 2007).

Um eine möglichst sensitive Früherkennung durch Anamnese möglich zu machen, gibt es mehrere neuropsychologische Tests, wie z.B. den Mini Mental Status Test

(Folstein et al. 1975) (MMST, siehe Anhang 8.1).

In der Anamnese sollte auf alle kognitiven Defizite eingegangen werden. So sollte abgefragt werden, ob Defizite des kognitiven Gedächtnisses, der räumlichen Wahrnehmung, der Wortfindung, der Geschwindigkeit des Denken und Handelns, des Urteils- und Auffassungsvermögens vorliegen. Außerdem sollte erfragt werden, ob es psychiatrische Symptome wie Veränderungen von Antrieb und Aktivität, Wahnsymptome, Veränderungen der Stimmungslage gibt. Auch neurologische Symptomatiken, wie Gang- oder Bewusstseinsstörungen sollten abgeklärt werden. Der neurologische Untersuchungsbefund ist im frühen Stadium der AD meist unauffällig (Wallesch und Förstl 2005).

Allerdings kann es, wie schon erwähnt, auch im Frühstadium zu olfaktorischen Defiziten kommen (Hyposmie) (Peters et al. 2003).

Der psychische Befund zeigt meist, dass eine gestörte Orientierung zu Zeit und Ort vorliegt. Die Patienten fühlen sich gesund, von der Gedächtnisstörung abgesehen. Die häufigste psychiatrische Störung im Rahmen der Alzheimer-Krankheit ist eine depressive Verstimmung, es kann aber auch zu paranoiden Befürchtungen kommen. In der Computertomographie findet sich meist ein Normalbefund mit altersassoziierter Hirnatrophie (Förstl 2000). Allerdings können durch die Bildgebung andere zerebrovaskuläre Ursachen einer Demenz identifiziert werden, wie zerebrale Infarkte oder Läsionen in der weißen Substanz, die zu vaskulärer oder gemischter Demenz führen (Blennow et al. 2006).

Die Laboruntersuchung dient vor allem dazu, sekundäre Ursachen der Demenz auszuschließen, wie z.B. einen Vit.-B12- oder Folsäuremangel. Neuere Forschungsansätze sind, spezifische Biomarker für die Alzheimer-Demenz zu finden, die durch einfache Labortests, wie Blutuntersuchungen oder Liquorpunktionen die Diagnose erhärten können. So gehört heute die Untersuchung des Liquors auf A β zur Diagnoseklärung mit zum Prozedere.

So konnte festgestellt werden, dass bei Alzheimer-Patienten, die Relation A β 1-42/A β 1-40 erniedrigt ist.

Außerdem wird die PET (Positronen-Emissions-Tomographie) erforscht, in der der Glukosemetabolismus des Gehirns gemessen werden kann. Auch die Messung der Temporallappenatrophie im MRT bietet neue Ansätze (Blennow et al. 2006).

1.1.5 Therapie der Alzheimer-Krankheit

Bis heute gibt es nur symptomatische medikamentöse Therapien der Alzheimer-Krankheit. Eine Therapie, die die Ursachen behebt, ist das Ziel der Alzheimer-Forschung. Die symptomatischen Therapien der Alzheimer-Demenz beruhen auf der Erkenntnis, dass Neurotransmitter und speziell die Veränderung der Mengen eine Rolle bei der Alzheimer-Demenz spielen.

Ein wichtiger Neurotransmitter ist das Acetylcholin (ACh). Die cholinerge Hypothese der Demenz ist dabei, dass cholinerge Neuronen im basalen Vorderhirn (Nucleus Basalis Meynert) zugrunde gehen und damit im Hippocampus und Neocortex Störungen verursacht werden, sodass es zu Gedächtnisverlusten kommt (Terry und Buccafusco 2003).

Ein therapeutischer Ansatz ist nun, die Verfügbarkeit von Acetylcholin zu erhöhen, indem man die Acetylcholinesterase, die für den Abbau des ACh zuständig ist, hemmt.

So sind die ACh-Esterase-Inhibitoren Donepezil, Rivastigmin und Galantamin für die Behandlung des M. Alzheimer zugelassen. Donepezil und Galantamin sind selektive Inhibitoren, wohingegen Rivastigmin auch die Butyrylcholinesterase hemmt (Blennow et al. 2006). Diese Medikamente zeigten in mehreren Studien moderate positive Effekte auf die kognitiven Fähigkeiten der Patienten, so konnte nach 3-6 Monaten eine Verbesserung des MMST um 1-4 Punkte festgestellt werden (Birks 2006).

Eine weitere Substanz in der Alzheimer-Therapie ist das Memantin. Dieses ist ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist.

Im gesunden Nervensystem ist Glutamat und sein NMDA-Rezeptor sehr wichtig für Lern- und Gedächtnisprozesse. In einigen Fällen, wie bei der Alzheimer-Demenz, kann es dazu kommen, dass erhöhte Aktivität des Glutamats zu einer niedrigeren Erregbarkeit des NMDA-Rezeptors führt, was dann zu gestörten neuronalen Funktionen führt (Areosa et al. 2005).

Memantin wirkt als Antagonist des NMDA-Rezeptors, ohne die physiologischen Funktionen des Rezeptors zu beeinflussen (Wilcock 2003). In Studien konnte ein positiver Effekt auf kognitive Symptome und eine verbesserte Fähigkeit, tägliche Aktivitäten zu bewältigen, gezeigt werden (Wilcock 2003).

Allerdings konnte kein Effekt bei leichter Demenz nachgewiesen werden, sodass man davon ausgehen kann, dass vor allem Patienten mit mittelschwerer bis

schwerer Form der Demenz von dieser Art der Therapie profitieren (Areosa et al. 2005).

Besonders in späteren Stadien der Erkrankung kommt es auch zu Verhaltensauffälligkeiten bei den Patienten. Sie können Aggressionen, psychomotorische Agitationen und Halluzinationen zeigen. Um diese Symptome zu behandeln, bedient man sich atypischer antipsychotischer Therapeutika, die weniger Extrapyramidalsymptome, wie Parkinsonismus und Spät-Dyskinesien verursachen. So werden Risperidon und Olanzapin erfolgreich eingesetzt (Brodaty et al. 2003, Street et al. 2000). Aber auch Antikonvulsiva, wie Valproat und Carbamazepin, sowie Benzodiazepine (Lorazepam und Oxazepam) kommen in der symptomatischen Behandlung zum Einsatz (Masterman 2003).

Neben der symptomatischen Therapie wird hauptsächlich versucht, Substanzen zu finden, die die Krankheit modifizieren, nicht nur die Symptomatik verbessern.

Dabei spielt die Erforschung der Pathogenese des M. Alzheimer eine große Rolle. Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass vor allem versucht wird, die A β -Produktion und -Aggregation zu verhindern. Ein weiterer Fokus besteht darin, den A β -Abbau im Gehirn zu erhöhen (Blennow et al. 2006).

So wird versucht, die Sekretasen, die für die A β -Synthese verantwortlich sind, zu modulieren. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der β -Sekretase in transgenen Alzheimer-Mäusen zu reduzierten A β -Mengen geführt hat (Chang et al. 2004).

Aber auch eine A β -Immuntherapie steht in der Diskussion. So konnte in AD-transgenen Mäusen eine aktive Immunisierung mit dem Protein A β eine abgeschwächte Ablagerung des Amyloids im Hirngewebe erzeugen (Schenk et al. 1999). Klinische Versuche, die aktive Immunisierung mit A β bei Menschen durchzuführen, mussten aufgrund auftretender Enzephalitiden abgebrochen werden (Orgogozo et al. 2003). Es wird daher weiterhin versucht, eine Vakzine zu entwickeln, bei der das Risiko für solch erhebliche Nebenwirkungen reduziert ist (Blennow et al. 2006).

Neben der Immunisierung gibt es auch Versuche, A β -Fibrillisations-Inhibitoren zu entwickeln (Permanne et al. 2002).

1.2 Neuropathologie und molekulare Genese des M. Alzheimer

1.2.1 Neurofibrilläre Tangles

Eine der charakteristischen Läsionen bei der Alzheimer-Krankheit sind neurofibrilläre Tangles in den medialen Temporallappenstrukturen und den kortikalen Regionen des Gehirns. Diese bestehen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (Grundke-Iqbal et al. 1986; Nukina und Ihara 1986). Tau ist ein normales axonales Protein, das an Mikrotubuli bindet und damit die Stabilität der Mikrotubuli fördert (Blennow et al. 2006). Das hyperphosphorylierte Tau-Protein hat zur Folge, dass der axonale Transport von Stoffwechselprodukten gestört ist und damit auch die neuronale und synaptische Funktion nicht mehr gewährleistet ist. Es ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt, ob die Hyperphosphorylierung und Tangle-Ausbildung die Ursache oder eine Folge der Alzheimer-Demenz sind (Blennow et al. 2006). Allerdings wurde verändertes, aggregiertes Tau-Protein auch in anderen Erkrankungen unabhängig von A β -Ablagerungen gefunden (z.B. Subakute Sklerosierende Panenzephalitis), sodass angenommen wird, dass die Tangles als Antwort auf viele neuronale Insulte entstehen können und somit auch bei der Alzheimer-Krankheit eher als Antwort auf die Akkumulation von A β und A β -assoziierten Molekülen zu verstehen ist (Selkoe 2001). Da diese Arbeit sich jedoch nicht näher mit den neurofibrillären Tangles beschäftigt, soll hier nicht weiter auf diese pathologische Struktur eingegangen werden.

1.2.2 Amyloid- β -Plaques

Das zweite charakteristische neuropathologische Merkmal bei der Alzheimer-Demenz sind Plaques, die aus extrazellulärer Amyloidablagerung und assoziierten axonalen und dendritischen Verletzungen bestehen. Eine große Anzahl dieser Plaques findet sich im limbischen und assoziativen Cortex (Dickson 1997). Man kann hierbei zwischen zwei Formen von Plaques unterscheiden: So gibt es zum einen neuritische Plaques, die, wie oben erwähnt, mit axonaler Schädigung in Verbindung stehen, zum anderen gibt es diffuse Plaques, die eine Vorform der neuritischen Plaques darstellen (Selkoe 2001).

Die diffusen Plaques finden sich im limbischen und assoziativen Cortex, aber auch im Thalamus, Nucleus caudatus, Putamen und Cerebellum. Dabei gibt es keine fibrillären, kompakten Zentren der Plaques, außerdem konnten wenig bis keine dystrophen Neuriten in der Umgebung dieser Plaques gefunden werden (Tagliavini

et al. 1988). Die diffusen Plaques bestehen fast ausschließlich aus A β -42 (Iwatsubo et al. 1994). Diffuse Plaques kommen auch bei älteren, nicht-dementen Menschen vor (Selkoe 2001).

Die neuritischen Plaques beinhalten Ablagerungen von A β , die vor allem in filamentöser Form auftreten. Innerhalb dieser Plaques und unmittelbar um die Plaques herum treten dystrophe Neuriten auf, die oft dilatiert und gewunden sind. Außerdem zeigen sie oft vergrößerte Lysosomen, viele Mitochondrien und gepaarte helikale Filamente. Auch Astrozyten umgeben diese Plaques. Dies weist auf eine Schädigung der Neuriten hin (Selkoe 2001). Die Hauptformen des A β in den neuritischen Plaques sind das A β -42, welches länger und hydrophober ist und zu Aggregationen neigt als A β -40 (Jarrett et al. 1993) sowie das A β -40.

1.2.3 Das Amyloid-Vorläufer-Protein (Funktion und Prozessierung)

Amyloid- β entsteht aus einem Vorläuferprotein, dem APP (Amyloid Precursor Protein). Das Gen, das für dieses Protein kodiert, liegt auf dem Chromosom 21 (Selkoe 2001). APP ist ein Polypeptid zwischen 110 und 140 kDa, je nach Isoform. Es gibt 3 Isoformen, APP695, APP751, APP770, die posttranslational durch Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung modifiziert werden (Hung und Selkoe 1994). In Neuronen ist vor allem die Isoform APP695 vorhanden, die in nicht-neuronalen Zellen sehr selten vorkommt (Haass et al. 1991). APP gehört zu der Familie der APLP's (Amyloid precursor-like proteins). Es gibt nun verschiedene Wege der APP-Prozessierung. So gibt es einen amyloidogenen Weg, in dem das A β entsteht, und einen nicht-amyloidogenen Weg. Dabei ist der nicht-amyloidogene Weg der Hauptweg; es ist aber möglich, dass beide Wege parallel ablaufen können (Blennow et al. 2006).

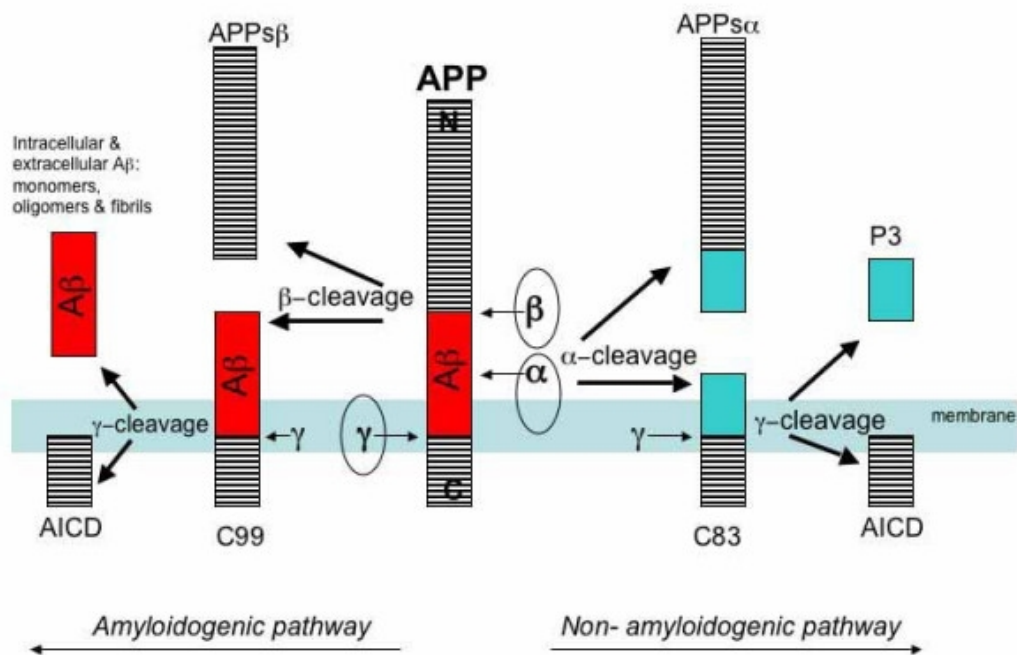


Abb. 1.1: APP-Metabolismus (Quelle: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/figures/1750-1326-2-22-1.jpg>)

Beim nicht-amyloidogenen Weg wird zunächst das APP von der α -Sekretase in der A β -Region geschnitten, sodass kein A β mehr gebildet werden kann. Es resultieren ein Fragment, das APPs α genannt wird, und ein membranständiges C83-Fragment, das wiederum von der γ -Sekretase zu einem p3-Fragment und einem membranständigen AICD-Fragment gespalten wird (Esch et al. 1990).

Um A β zu produzieren, muss das APP von zwei Sekretasen gespalten werden. So ist in Abb. 1.1 zu erkennen, dass zunächst die β -Sekretase das APPs β abspaltet, wobei in der Membran dann ein C99-Fragment zurückbleibt, welches dann durch die γ -Sekretase zu A β und einem in der Membran verbleibenden AICD-Fragment gespalten wird (Selkoe 2001). Die γ -Sekretase ist ein intramembranöser Proteasekomplex, der aus Präsenilin, Nicastrin, PEN-2 und APH-1 besteht (Gandy 2005). Die Aktivität der β -Sekretase wird durch die BACE1 (β -site APP-cleaving enzyme 1) bestimmt (Vassar et al. 1999). Es gibt nun mehrere Theorien, wie es zum Auftreten der Demenz kommt.

Die eine Hypothese ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Hardy und Allsop 1991). Hierbei wird angenommen, dass ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau von A β im Gehirn das initiale Ereignis sind, die als Folge zu neuronaler Degeneration und Demenz führen (Hardy und Selkoe 2002). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Untersuchungen an familiär bedingter Demenz, da dort Mutationen in den Genen für APP und auch Präsenilin vorliegen. Des Weiteren konnte bei Patienten mit Trisomie 21 festgestellt werden, dass eine frühe Ablagerung von A β -Plaques auftritt, verursacht durch eine Überexpression von APP, da das Gen hierfür dreifach vorhanden ist.

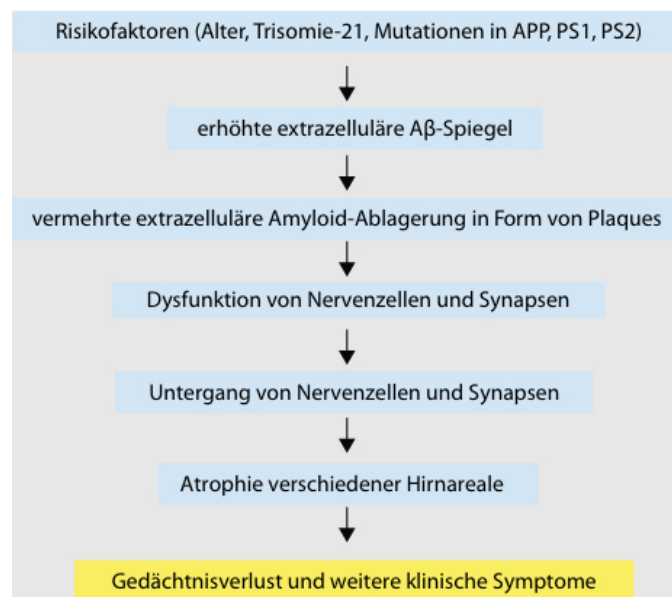


Abb. 1.2: Amyloid-Kaskaden-Hypothese
(Quelle: Bayer, Wirths 2008)

Auf der anderen Seite gibt es eine modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die nicht davon ausgeht, dass extrazelluläre Amyloid- β Ablagerungen (Plaques) der zentrale Trigger sind, sondern intrazelluläre A β -Ablagerungen.

Die Modifizierung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese beruht auf der Tatsache, dass die Menge an A β -Plaques nicht mit dem Stadium der Alzheimer-Krankheit korreliert, wohingegen die Menge an neurofibrillären Tangles (Arnold et al. 1991, Braak und Braak 1991) gut mit dem Phänotyp der Erkrankung übereinstimmt (Morrison und Hof 1997). Zuerst wurde intrazelluläres A β in einer neuronalen Zelllinie von Wertkin et al. beobachtet (Wertkin et al. 1993). Allerdings konnte schon früher gezeigt werden, dass Amyloid zuerst im Neuron abgelagert wird und später erst extrazellulär auftritt (Masters et al. 1985). 2004 konnte in Gehirnen von Alzheimer-Patienten auch gezeigt werden, dass intrazelluläre A β -Akkumulation vor

der Ausbildung von neurofibrillären Tangles auftritt (Fernandez-Vizarra et al. 2004). Weiterhin zeigte sich in transgenen Alzheimer-Mäusen (APP751/PS1-transgen) intrazelluläres A β als frühes Merkmal, wobei die Menge mit der Ausbildung von extrazellulären Plaques abgenommen hat (Wirhth et al. 2002). Dieses konnte auch bei Patienten mit Trisomie 21 gefunden werden (Mori et al. 2002). Dass Amyloid- β eine toxische Wirkung hat, konnte ebenfalls in dem genannten Mausmodell gezeigt werden, da dort Neuronenverlust im Hippocampus unabhängig von dem Auftreten von extrazellulären Plaques auftrat (Schmitz et al. 2004). Auch transgene Mäuse, die A β -42 in Neuronen überexprimieren, zeigten starke Neurodegeneration (LaFerla et al. 1995).

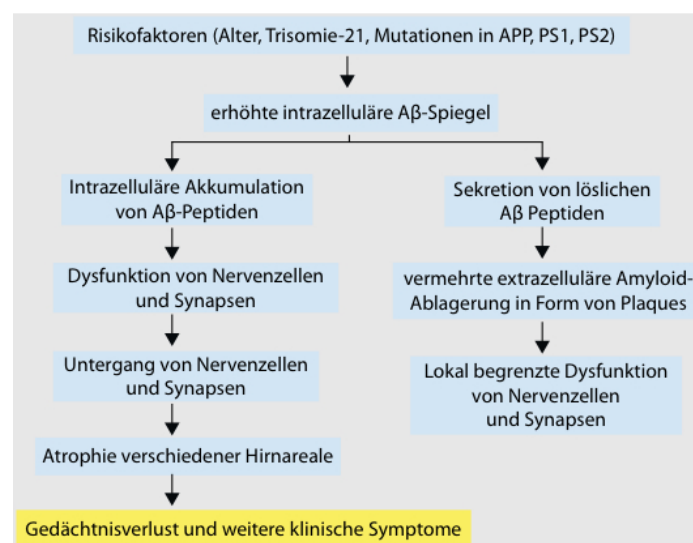


Abb. 1.3: Modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Quelle: Bayer, Wirhth 2008)

1.3 Angst in der Alzheimer-Krankheit

1.3.1 Physiologie der Angst

Angst ist definiert als: „unangenehm empfundener, eine Bedrohung oder Gefahr signalisierender emotionaler Gefühlszustand; erhält unter Umständen Krankheitswert, wenn sie ohne erkennbaren Grund bzw. infolge inadäquater Reize ausgelöst und empfunden wird. Angst kann in unterschiedlichen Schweregraden auftreten und ist in der Regel begleitet von psychischen und physischen Symptomen.“ (Psyhyrembel 2010, S. 99).

Emotionales Verhalten, wie hier die Angst, ist abhängig von der Amygdala, einer Region des Temporallappens (Braak und Braak 1991; Hyman et al. 1990). Die

Amygdala hat eine Mandelform und befindet sich im medialen Temporallappen (Sah et al. 2003).

Viele Studien konnten in der Vergangenheit zeigen, dass die Amygdala eine zentrale Struktur des emotionalen Verarbeitens ist. So haben Klüver und Bucy schon 1937 gezeigt, dass Läsionen im medialen Temporallappen von Affen das emotionale Verhalten dahingehend verändern, dass sie Wut, Angst und soziale Interaktionen verloren („Klüver Bucy Syndrom“) (Klüver und Bucy 1937). Auch alleinige Läsionen der Amygdala zeigten Verlust von Angst und Wut (Weiskrantz 1956).

Die Amygdala besteht aus einem Komplex von ungefähr 13 Kerngebieten. Diese wiederum sind nochmals unterteilt und haben viele internukleäre und intranukleäre Verbindungen (Pitkänen 2000). Die Gruppen der Kerngebiete können grob in 3 Gruppen unterteilt werden: So gibt es die basolaterale Gruppe, die cortex-ähnliche Gruppe sowie die zentromediale Gruppe.

Die Funktion der basolateralen Gruppe ist die Verarbeitung der ersten Afferenzen, die bei einer Gefahrensituation vom sensorischen Cortex eingehen und die Weiterverteilung dieser Informationen zu anderen Kerngebieten der Amygdala. Die cortex-ähnliche Gruppe ist vor allem für die Verarbeitung der olfaktorischen Informationen zuständig und die zentromediale Gruppe der Amygdala empfängt wiederum die prozessierten Informationen der basolateralen Amygdala und gibt sie weiter an hypothalamische und Hirnstamm-Regionen, ist also für die Antwort des autonomen Nervensystems auf Reize mit zuständig (Sah et al. 2003).

Die zentralen Afferenzen zur Amygdala sind corticale und thalamische Strukturen, sowie Informationen aus dem Hypothalamus und Hirnstamm. Die Hauptquelle der sensorischen Informationen, die die Amygdala erreichen ist der cerebrale Cortex (McDonald 1998). Die Informationen aus dem Hypothalamus und Hirnstamm stammen von Verhaltens- und autonomen Systemen. Hippocampus, präfrontaler Cortex, sowie der perirhinale Cortex geben polymodale Informationen an die Amygdala weiter.

Die Efferenzen, die von der Amygdala ausgehen, sind ebenfalls weitläufig. So werden viele Informationen zurück an den Cortex gegeben, aber auch zum Hypothalamus, Thalamus und zum Hirnstamm (Sah et al. 2003).

Durch die Verarbeitung der Informationen in der Amygdala, kann eine spezifische, auf die Situation abgestimmte Reaktion ausgelöst werden. So sind in Angstsituationen beispielsweise der Blutdruck und die Herzfrequenz erhöht und der

Hormonspiegel von Noradrenalin, Adrenalin und Cortisol angestiegen (Maren 2001).

1.3.2 Angstverhalten bei Alzheimer-Patienten

Angst ist bei Patienten mit Demenz weit verbreitet und geht mit geringer Lebensqualität einher. Dabei ist es sehr schwierig, Angst bei Alzheimer-Patienten zu definieren, da ein Überlappen von Angst, Depression und Demenz besteht. Außerdem spielt der Einfluss der Informationsquelle (z.B. pflegende Verwandte) über die Symptome eine große Rolle (Seignourel et al. 2008). Die Prävalenz der Angst ist bei Demenzpatienten hoch, so zeigen 5-21% Angststörungen (Ferretti et al. 2001) und 8-71% Angstsymptome (Ballard et al. 2000). Die Angst nimmt allerdings mit Schwere der Krankheit ab (Seignourel et al. 2008). Angst ist verbunden mit einer schlechteren Lebensqualität, problematischem Verhalten, Alltagsproblemen, Erwachen in der Nacht und schlechterer neuropsychologischer Leistung (Hoe et al. 2006). Es ist weiterhin schwierig zu definieren, ob die Angst eine eigene Erkrankung ist oder direkt mit der Demenz in Verbindung steht. Dies ist jedoch sehr wahrscheinlich, da Neurodegeneration auch in limbischen Strukturen vorkommt und Angst bei Demenz-Patienten häufiger auftritt als bei gesunden Menschen (Bungener et al. 1996). Um die Ängste genauer zu untersuchen, bedient man sich spezieller Tests, die nicht-kognitives Verhalten genauer beleuchten. So gibt es zum einen den BEHAVE-AD Test, der Angehörige der Patienten zu Symptomen wie Angstverhalten befragt (Reisberg et al. 1996). Außerdem gibt es den NPI-Test (Neuropsychologisches Inventar), der ebenfalls Verhaltensauffälligkeiten abfragt (Cummings et al. 1994) (siehe Anhang 8.2, S. 72).

1.3.3 Angstverhalten bei AD-transgenen Mäusen

Auch bei verschiedenen AD-transgenen Mausmodellen sind Veränderungen im Angstverhalten, verglichen mit nicht-transgenen Mäusen, beobachtet worden. So konnte festgestellt werden, dass 3xTg-Mäuse, die in Kapitel 1.4.3 näher beschrieben werden, in Versuchen, die das Angstniveau messen, eine gesteigerte Angstreaktion im Fear Conditioning Test zeigten. Außerdem zeigten sie auch in der Light-Dark Box eine erhöhte Freezing-Zeit verglichen mit Wildtyp-Tieren. Auch zeigten sie eine signifikant niedrigere Rate an Eintritten in die helle Box, was auch für ein erhöhtes Angstniveau spricht (España et al. 2009). In einer anderen Mauslinie, der APP/PS1 (APP695-swe, PS1-dE9) wurde hingegen festgestellt, dass

diese Mäuse ein signifikant geringeres prozentuales Freezing als Reaktion auf auditorisches Fear Conditioning zeigten als nicht-transgene Mäuse. Diese Mäuse zeigen außerdem ein vermindertes Angst-Gedächtnis (Knafo et al. 2009). Auch in PS2-transgenen Mäusen wurde ein vermindertes Angstverhalten mit Hilfe des Elevated Plus Maze und der Light-Dark Box festgestellt. So zeigten diese Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an Besuchen der offenen Arme und auch einen höheren Anteil an Zeit in den offenen Armen, was für ein vermindertes Angstverhalten spricht. Sie verbrachten außerdem einen niedrigeren Anteil in der dunklen Box als Wildtyp-Tiere (Yuk et al. 2009). Auch in der Arbeit von Cotel et al. 2010 konnte gezeigt werden, dass APP/PS1KI-Mäuse bereits ab dem Alter von 2 Monaten ein signifikant vermindertes Angstverhalten zeigen (Cotel et al. 2010). Somit lässt sich festhalten, dass verschiedene AD-transgene Mauslinien in Bezug auf das Angstverhalten verschiedene Veränderungen zeigen, so konnten sowohl erhöhte als auch erniedrigte Angstniveaus festgestellt werden.

1.4 Verwendete transgene Mausmodelle

Um die Pathologie des Morbus Alzheimer genauer untersuchen zu können, bedient man sich transgener Mäuse, die Mutationen in ihrem Genom haben, die mit der familiären Form der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht werden. Dabei handelt es sich zumeist um Mutationen im Gen für APP und in den Genen für Präsenilin 1 und 2.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Mausmodelle betrachtet, die im folgenden näher erläutert werden.

1.4.1 APP/PS1KI

Das Mausmodell APP/PS1KI wurde 2004 von Casas et al. entwickelt, da es die typische Alzheimer-Pathologie, sowie zusätzlich signifikanten hippocampalen Neuronenverlust zeigt (Casas et al. 2004).

Die Generierung dieser Mauslinie erfolgte folgendermaßen: Zuerst wurde eine PS1 knock-in Maus erzeugt, die die Mutationen M233T und L235P im murinen Präsenilin 1 Gen zeigt. Diese Mutationen stehen unter der Kontrolle des murinen PS1 Promotors und stehen in Zusammenhang mit der sehr früh beginnenden FAD mit 29 und 35 Jahren (Kwok et al. 1997; Campion et al. 1996). Diese Maus wurde dann gekreuzt mit einer APPSL Maus, die humanes APP mit der London- (V717I) und Schwedisch- (K670N/M671L) Mutation überexprimiert. (Blanchard et al.

2003). Diese Mutationen stehen unter der Kontrolle des murinen Thy1 Promotors, der dafür verantwortlich ist, dass die Überexpression vor allem im ZNS existiert (Caroni 1997). Bei diesem Mausmodell gibt es eine Reihe von pathologischen Merkmalen, die in Verbindung mit der Alzheimer-Krankheit stehen: So ist zum einen eine starke A β -Akkumulation schon ab 2 Monaten im Gehirn dieser Mäuse zu beobachten, dabei spielt vor allem das A β -42 eine große Rolle. Eine robuste Anhäufung von A β zeigt sich im Cortex, im Hippocampus sowie im Thalamus. Desweiteren zeigen diese Tiere eine reduzierte Dicke der hippocampalen Pyramidenzellschicht (CA1&2) mit einem Alter von 10 Monaten (Casas et al. 2004). Allerdings zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein Zellverlust im CA3-Band. Auch im Gyrus dentatus konnte ein altersabhängiger Zellverlust nachgewiesen werden (Cotel et al. 2008). Zu erwähnen ist hier auch, dass der Zellverlust im Hippocampus nicht in lokalem Zusammenhang mit A β -Plaques steht. Außerdem zeigt dieses Modell eine starke A β -Akkumulation innerhalb der Zellen, die mit dem Zellverlust in Verbindung gebracht wird (Casas et al. 2004). Diese intrazelluläre Ansammlung von A β lässt sich allerdings nicht im Gyrus dentatus finden (Cotel et al. 2008). Neben den Nervenzellen sind auch die axonalen Veränderungen untersucht worden. Dabei zeigten sich im Rückenmark schon ab 2 Monaten starke axonale Schwellungen (Wirhth et al. 2007).

Phänotypisch zeigt die APP/PS1KI-Maus besonders motorische Defizite. Ab 6 Monaten zeigen diese Tiere schwere Defizite in Verhaltensversuchen wie dem Rotarod-Test, Balance Beam, String suspension (Wirhth et al. 2008). Auch ein signifikanter Verlust des Körpergewichts ist ab dem Alter von 6 Monaten zu verzeichnen. Beobachtet wurde auch eine thorakolumbale Kyphose, die ebenfalls ab 6 Monaten beginnt. Auch Defizite im Arbeitsgedächtnis konnten gezeigt werden (Wirhth et al. 2008).

1.4.2 5xFAD

Im Jahr 2006 wurde das Mausmodell 5xFAD von Oakley et al. entwickelt. Dieses Mausmodell besitzt 5 FAD- Mutationen. Dabei wurden zunächst die Mutationen APP K670N/M671L (Schwedisch), I716V (Florida), V717I (London) und PS1 M146L und L286V in die APP695 und PS1 cDNA eingeführt. Diese Transgene wurden dann in Vorkerne der c57/B6XSJL Embryos injiziert (Oakley et al. 2006).

Alle Mutationen stehen unter der Kontrolle des murinen Thy1-Promotors, der für eine Überexpression im Gehirn sorgt (Moechars et al. 1996).

Somit tragen die 5xFAD-Mäuse die Schwedisch-, die Florida- und die London-APP-Mutation sowie zwei Präsenilin-Mutationen. Die Mutation Schwedisch erhöht die Produktion des totalen A β , wohingegen die Mutationen Florida, London und die PS1-Mutationen speziell die Produktion des A β 42 erhöhen (Sisodia et al. 1999). Dieses Mausmodell zeigt ebenfalls eine hohe Ratio A β 42/A β 40. Die Level des A β 42 steigen fast linear zum Alter. Proportional zum A β 42-Level steigt auch die Plaque-Ablagerung in diesem Modell (Oakley et al. 2006). Die ersten Plaques entstehen dabei in tiefen Schichten des Cortex und im Subiculum schon im Alter von 2 Monaten (Ohno et al. 2007). In höherem Alter sind die Plaques über viele Regionen des Gehirns, wie Hippocampus, Thalamus, Hirnstamm verteilt. Neben Plaques zeigt diese Mauslinie auch Neuroinflammation, d. h. dass Astrozyten und Mikrogliazellen aktiviert sind. Dies ist ähnlich zur Pathologie, die bei Alzheimer Patienten beobachtet wurde (Oakley et al. 2006). Ein interessantes Phänomen ist außerdem, dass vor dem Erscheinen von Plaques intrazelluläres A β in diesem Modell anzufinden ist, dabei vor allem in tiefen Schichten des Cortex und im Subiculum. Auch in den 5xFAD-Mäusen kommt es zu Neurodegeneration und Neuronenverlust. So konnte eine Verminderung der Neuronenzahl in der 5. Schicht des Cortex verglichen zur Kontrolle nachgewiesen werden. Phänotypisch zeigen diese Mäuse Defizite im Arbeitsgedächtnis ab 6 Monaten, vereinbar mit der beobachteten synaptischen Dysfunktion, die ebenfalls mit 6 Monaten beginnt (Kimura und Ohno 2009). Auch im Fear Conditioning Test zeigten sich Defizite des hippocampalen Gedächtnisses (Ohno 2009).

1.4.3 3xTg

Das Mausmodell 3xTg wurde von Oddo et al. 2003 entwickelt. Die tripel-transgenen Mäuse besitzen in ihrem Genom 3 Mutationen.

Zunächst wurde die Schwedisch-APP-Mutation (K670M/M671L) sowie die Tau-Mutation P301L in die Vorkerne von homozygoten PS1-(M146V)-Embryos eingebracht und zurückgekreuzt mit den parental PS-KI-Mäusen (Oddo et al. 2003). Die Mäuse haben also eine APP-Mutation (Schwedisch), eine Tau-Mutation sowie eine Präsenilin-Mutation. Dies unterscheidet das tripel-transgene Modell von den oben genannten, da weder das APP/PS1KI- noch das 5xFAD- Modell eine Tau-

Mutation in ihrem Genom haben. Alle drei Mutationen stehen unter der Kontrolle des murinen Thy1-Promotors. Die Mauslinie 3xTg zeigt extrazelluläre A β -Ablagerungen vor der Tangle-Ausbildung.

Außerdem zeigen die Mäuse vor der Plaquebildung synaptische Dysfunktionen in Form von Defiziten in der Langzeitpotenzierung. Diese Dysfunktion ist gekoppelt an das zuerst auftretende intrazelluläre A β (Oddo et al. 2003). Zunächst wird dieses in neocorticalen Regionen (3 Monate) und im CA1-Band des Hippocampus (6 Monate) gefunden.

Ab dem Alter von 6 Monaten treten auch erste Plaques im Frontalcortex auf, mit der Alterung erscheinen diese dann auch in anderen Regionen, wie dem Hippocampus. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Hauptform des A β das A β 42 ist. Taupathologie ist dagegen im CA1-Band des Hippocampus erst ab 12 Monaten festzustellen (Oddo et al. 2003). Phänotypisch wurde eine Erhöhung des Angstniveaus ab 6 Monaten bei dieser Mauslinie festgestellt. Dies wird in Zusammenhang mit intrazellulärem A β in der Amygdala gebracht, welches bei dieser Mauslinie gefunden worden ist. Das intraneuronale A β tritt hierbei vor allem in glutamatergen Pyramidenzellen der Amygdala auf (España et al. 2009).

1.5 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, eine neuropathologische Erklärung für verändertes Angstverhalten in verschiedenen transgenen Mauslinien zu finden. Dabei wird eine neuropathologische Untersuchung der Amygdala durchgeführt, um eine eventuelle Korrelation zum Angstverhalten der Mäuse herstellen zu können.

In früheren verhaltenbiologischen Versuchen (Cotel et al. 2010; España et al. 2009) konnte gezeigt werden, dass die transgenen Mauslinien APP/PS1KI sowie 3xTg ein verändertes Angstverhalten im Vergleich zu Kontrolltieren aufweisen. So zeigen APP/PS1KI-Mäuse ab dem Alter von 2 Monaten ein signifikant vermindertes Angstverhalten als Wildtypiere.

Dagegen konnten España et al. zeigen, dass die 3xTg-Mäuse mit einem Alter von 6 Monaten ein signifikant höheres Angstniveau haben als Kontrolltiere. Ziel dieser Arbeit ist es nun, verhaltensbiologische Untersuchungen an der 5xFAD-Linie durchzuführen, um zu überprüfen, ob auch hier eine Veränderung im Angstniveau vorliegt.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt jedoch in der neuropathologischen Untersuchung der Amygdala, um die Hypothese zu überprüfen, dass intrazelluläres Amyloid- β für das veränderte Angstverhalten verantwortlich ist. Außerdem sollen die zur Amygdala projizierenden Gebiete auf intraneuronales A β untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Transgene Mäuse

In dieser Arbeit wurden APP/PS1KI-Mäuse untersucht, die humanes APP751 mit der Schwedisch- und London-APP-Mutation, unter Kontrolle des murinen Thy-1 Promotors, exprimieren, wohingegen das murine PS1 mit zwei FAD-assoziierten Mutationen (PS1 M233T und PS1 L235P) unter der Kontrolle des endogenen Maus PS1 Promotors steht.

Außerdem wurden 5xFAD-Mäuse untersucht. Diese tragen 3 APP-Mutationen (Schwedisch, Florida, London) und 2 PS1-Mutationen (M146L, L286V), die alle unter der Kontrolle des murinen Thy-1 Promotors stehen. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurden die Verhaltensversuche durch eine Versuchsreihe mit Wildtyp-Mäusen ergänzt.

Immunhistochemisch wurden außerdem noch 3xTg-Mäuse untersucht. Diese sind tripel-transgen, d. h., sie weisen die Schwedisch-Mutation des APP und eine Tau-Mutation (P301L) auf, die beide unter der Kontrolle des murinen Thy1-Promotors stehen, sowie eine PS1-Mutation (M146V).

Die tierexperimentellen Anteile der Arbeit wurden unter sorgfältiger Berücksichtigung des Deutschen Gesetzes für Tierschutz durchgeführt.

2.2 Perfusion der Mäuse

Die Mäuse wurden mittels eines Narkotikums (Ketamin, Xylazin) betäubt und transkardial mit ca. 5-10 ml eiskaltem PBS (phosphate buffered saline) perfundiert, anschließend wurde über die selbe Kanüle 5-10 ml eiskaltes 4%iges Paraformaldehyd gelöst in PBS eingeleitet, um das Gewebe zu fixieren. Dann wurde der Kopf mit einem Schnitt entlang der atlanto-axialen Verbindung abgetrennt und der Schädel in anteriorer Richtung eröffnet. Die Schädeldecke wurde vorsichtig geöffnet und das Gehirn entnommen. Entlang der Mittellinie wurden die beiden Hemisphären voneinander getrennt.

Die eine Hemisphäre wurde sofort auf Trockeneis eingefroren, um später für Proteinmessungen verwendet werden zu können. Die andere Hemisphäre wurde für 4 Tage in 4% Paraformaldehyd eingelegt, bevor sie in Paraffin eingebettet und für immunohistochemische Untersuchungen verwendet wurde.

2.3 Einbettung in Paraffin

Die Einbettung erfolgte mit Hilfe der Leica EG 1140 und der TP 1020 Einbettungsmaschine. Dabei wurden die Gewebeprobe in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und dann über die Zwischenstufe Xylol in heißem Paraffin eingebettet.

2.4 Arbeit am Mikrotom

Mikrotom HM 335 E

Schnittdicke: 4 μm

Abstand der auf Objektträger gezogenen Schnitte: 20 μm

Die Schnitte wurden sorgfältig vom Mikrotom in ein Wasserbad mit deionisiertem Wasser gelegt; mit einem Super Frost Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) wurden zwei aufeinanderfolgende Schnitte aufgefangen und in einem Wasserbad von 52 °C geglättet. Anschließend trockneten die Objektträger über Nacht in einem Wärmeschrank von 37 °C.

2.5 Immunhistochemische Färbung

2.5.1 Prinzipien

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung ist die Markierung von bestimmten Proteinen mit Antikörpern, die zu einer im Mikroskop deutlich sichtbaren Farbreaktion führen.

Es gibt Primär- und Sekundär-Antikörper. Man bedient sich je nach Färbemethode verschiedener Typen von Antikörpern.

Der Primär-Antikörper erkennt ein bestimmtes Epitop des Targetproteins (z.B. A β). Nachdem der Primär-Antikörper gebunden hat, inkubiert man darauffolgend die Schnitte mit dem Sekundär-Antikörper, der in einer anderen Spezies generiert wurde. Dieser wiederum bindet an die FC-Region des Primär-Antikörpers. Der sekundäre Antikörper kann konjugiert sein mit bestimmten Enzymen, die eine kolorimetrische Reaktion auslösen, oder mit Molekülen, die fluoreszieren.

2.5.2 ABC-Methode

Mithilfe des Avidin-Biotin-Systems können geringe Mengen an Antigenen (pg-fg) sichtbar gemacht werden, indem die kolorimetrischen Signale verstärkt werden. Dabei nutzt man die natürliche Affinität von Avidin zu Biotin, sodass ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC) entsteht, der zu dieser Signalverstärkung führt.

Bei Avidin handelt es sich um ein tertiäres Protein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa, welches in der Lage ist, vier Biotin-Moleküle zu binden. In der Immunhistochemie bedient man sich jedoch des Streptavidins, einem bakteriellen Avidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*, da es kein Glykoprotein ist und deshalb weniger unspezifische Bindungen aufweist.

Zunächst bindet also ein Antikörper an das zu untersuchende Antigen. Um dann einen Komplex entstehen zu lassen, benutzt man biotinylierte Sekundär-Antikörper. An diese Antikörper kann nun das Avidin binden, wobei das tetramere Protein mit jeweils drei der vier Bindestellen an das Biotin bindet.

Somit ergibt sich eine Signalverstärkung, die sehr sensitiv ist.

Ein Problem kann allerdings endogenes Biotin sein, das dann zu unerwünschten Hintergrundfärbungen führen kann.

2.5.3 DAB-Immunohistochemische Färbung

Die immunohistochemische Färbung wurde an 4 µm dicken, in Paraffin eingebetteten Schnitten durchgeführt.

Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert, indem sie zweimal für 5 min in ein Bad mit Xylol gegeben worden sind.

Dann folgte eine Hydratationsreihe, zunächst 10 min 100% Ethanol, dann 5 min 95% Ethanol, dann 5 min 70% Ethanol und zuletzt 1 min deionisiertes H₂O.

Um die Peroxidasen zu blocken, wurden die Schnitte für 30 min in 200 ml PBS mit 2 ml 30% H₂O₂ gelegt.

Anschließend wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer in der Mikrowelle für 2 min bei 800 Watt zum Kochen gebracht, und dann 8 min bei 80 Watt erhitzt.

Nach dem Abkühlen erfolgten 3 Waschstschritte; 1 min in deionisiertem H₂O, 15 min in PBS + 0.1% Triton und 1 min in PBS.

Für die Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 3 min in 88% Methansäure gelegt und dann für 5 min mit PBS gewaschen.

Mit einer unspezifischen Blocklösung aus PBS + 10% FCS (fetal cow serum) + 4% Milchpulver wurden die Schnitte dann für 1 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Es folgte dann die Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer mit den Primär-Antikörpern, die in PBS + 10% FCS gelöst waren.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte 15 min in PBS + 0.1% Triton gewaschen, dann für 1 min in PBS.

Anschließend wurden die Sekundär-Antikörper (1:200), gelöst in PBS + 10% FCS, aufgetragen und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift, erfolgte die Inkubation der Schnitte mit der ABC-Lösung. Diese beinhaltete Lösung A (1:100), Lösung B (1:100), gelöst in PBS + 10% FCS; und wurde mindestens eine halbe Stunde vor dem Auftragen hergestellt bei 4 °C aufbewahrt.

Nach dem 15 minütigen Waschen wurden die Schnitte mit einer DAB-Lösung (Diaminobenzidin) Sekunden bis Minuten inkubiert, bis eine Färbung auftrat.

Anschließend erfolgte wieder ein Waschschrift und daraufhin die Hintergrundfärbung für 40 Sekunden in gefiltertem Hämatoxylin, dann wurden die Schnitte in deionisiertes H₂O getaucht, und für 5 min unter dem laufenden Wasserhahn belassen.

Die Dehydratation erfolgte zunächst für 1 min in 70% Ethanol, dann 5 min in 95% Ethanol, dann 10 min in 100% Ethanol, und schließlich zweimal 5 min in Xylol.

Die Schnitte wurden mit „Eukitt Quick hardening mounting Medium“ und einem Deckgläschen bedeckt, um sie zu fixieren.

Fotographien wurden mit einer Olympus DP-50 Digitalkamera an einem Olympus Mikroskop BX51 aufgenommen.

2.5.4 Fluoreszenz-Doppelfärbung

Zunächst wurden die Schnitte in 2 x 5min Xylol entparaffiniert. Dann folgte eine Hydratationsreihe, zunächst 10 min in 100% Ethanol, dann 5 min in 95% Ethanol, dann 5 min in 70% Ethanol und zuletzt 1 min in deionisiertem H₂O.

Um die Antigene freizulegen, wurden die Schnitte in 10mM Citratpuffer für 2 min in der Mikrowelle bei 800 Watt zum Kochen gebracht und dann weitere 8 min bei 80 Watt erhitzt.

Nach dem Abkühlen erfolgten Waschschr tte mit deionisiertem H₂O, 0.01M PBS + 0,1% Triton und mit 0.01M PBS-Lösung, um die Membranen zu permeabilisieren.

Um intrazelluläres A β sichtbar zu machen, wurden die Schnitte für 3 min in 88% Methansäure gelegt. Nach einem weiteren Waschschr tt mit 0.01M PBS-Lösung wurde eine Blocklösung auf die Schnitte gegeben (0.01M PBS, 10% FCS, 4% Milchpulver) und für eine Stunde inkubiert.

Die zwei Primär-Antik rperarten wurden gemeinsam in 0.01M PBS + 10% FCS gelöst auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgte ein 15 minütiges Waschen in 0.01M PBS + 0,1% Triton.

Anschließend wurden die Sekundär-Antikörper auf die Schnitte gegeben und vor Licht gesch tzt 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

Nach einem weiteren 15 minütigem Waschschr tt in PBS, ebenfalls lichtgeschützt, wurde 1 min mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1,5mg/l) gefärbt und anschließend 1 min mit PBS gewaschen.

Das Eindeckeln erfolgte mit Hilfe des „Fluorescence protecting water based Medium“ (Dako cytomation, Dänemark).

Die Schnitte wurden lichtgeschützt aufbewahrt und zeitnah ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Olympus BX51 und der Digitalkamera Olympus DP-50. Die Lichtquelle war hierbei eine Quecksilberdampf-Lampe.

Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software ImageJ (Version 1.42q). Dabei wurden mehrere Fotos einer Region fusioniert, um genau erkennen zu können, in welchen Zellen sich A β befindet.

2.5.5 Verwendete Antikörper und ihre Epitope

Antikörper	Epitop	Konz.	Zweiter Antikörper	Firma
23850	N-Terminus APP	1:500	Anti-Rabbit	Gerd Multhaup (FU Berlin)
A β -(N)	N-Terminus A β 1-x	1:500	Anti-Rabbit	IBL (Deutschland)
2092	A β 1-16 (alle A β -Varianten)	1:500	Anti-Rabbit	Synaptic Systems (Deutschland)
4G8	A β 17-24	1:10000	Anti-Mouse	Signet (USA)
NF-200	Neurofilament 200 kD	1:1000, 1:500	Anti-Rabbit	Sigma (Deutschland)
Ubiquitin	Ubiquitin	1:500	Anti-Rabbit	DAKO (Dänemark)
AT8	Hyperphosph. Tau	1:500	Anti-Mouse	Innogenetics (Belgien)
692	Gesamt-A β	1:300	Anti-Rabbit	Gerd Multhaup (FU Berlin)
6E10	A β 1-17	1:2000	Anti-Mouse	Signet (USA)

Tab. 2.1: Verwendete Primär-Antikörper, alle Mouse-Antikörper monoklonal, alle Rabbit-Antikörper polyklonal

Name	Konz.	Firma
Rabbit Anti-Mouse (biotinyliert)	1:200	DAKO (Dänemark)
Swine Anti-Rabbit (biotinyliert)	1:200	DAKO (Dänemark)
AlexaFluor 568-konjugiert, Goat-Anti-Rabbit	1:200	Invitrogen (Deutschland)
AlexaFluor 488-konjugiert, Rabbit Anti-Mouse	1:200	Invitrogen (Deutschland)

Tab. 2.2: Details der polyklonalen Sekundär-Antikörper, die für die Immunhistochemie verwendet wurden

2.6 Synapsenquantifizierung

Die Synapsenquantifizierung wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung mit dem Antikörper Synaptophysin durchgeführt. Die Färbung ist wie in 2.5 beschrieben durchgeführt worden.

Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Olympus BX51 und der Digitalkamera Olympus DP-50. Die Lichtquelle war hierbei ebenfalls eine Quecksilber-Dampflampe, um die fluoreszierenden Moleküle sichtbar zu machen.

Mithilfe der Software ImageJ konnte nun der prozentuale Anteil der Synapsen am Gesamtbild errechnet werden.

2.7 Plaque-Load

Plaques sind, wie erwähnt, eine neuropathologische Schlüsselstruktur bei der Alzheimer-Krankheit. Um diese quantifizieren zu können, bedient man sich der immunhistochemischen Färbung sowie der Software ImageJ (Version 1.42q).

Zunächst wurden pro Maus drei bis vier Schnitte, die jeweils 20 μm auseinander liegen, mit einem A β -spezifischen Antikörper (z.B. 4G8, 1:10000) angefärbt. Auf eine Hintergrundfärbung mit Hämatoxylin wurde in diesem Fall verzichtet. Mit Hilfe des Mikroskops Olympus BX51 wurden dann von verschiedenen Regionen des Gehirns Aufnahmen gemacht. In dieser Arbeit wurden der Hippocampus, der präfrontale Cortex, sowie der Thalamus betrachtet. Diese sind, wie oben beschrieben, die wichtigsten Afferenzen zur Amygdala. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte nun in mehreren Schritten:

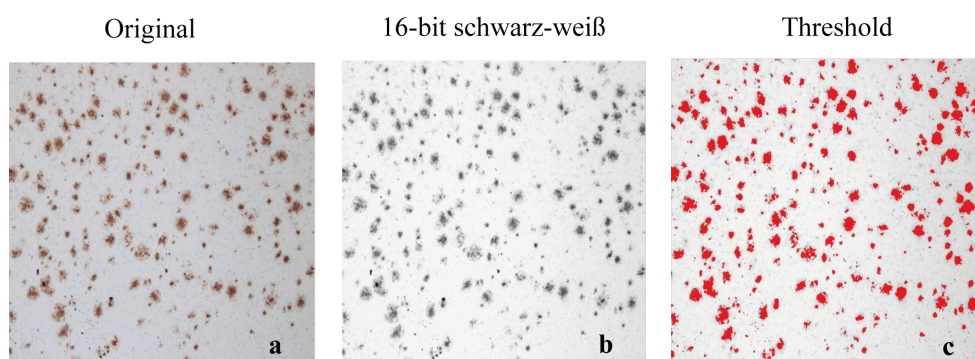


Abb. 2.1: Bildbearbeitung für den Plaque-Load, hier Präfrontaler Cortex 5xFAD, 6m (Antikörper 4G8 1:10000), Vergrößerung 40x

Zunächst wurde das Original-Bild (s. Abb. 2.1 a) in eine 16Bit Version konvertiert (schwarz-weiß) (s. Abb. 2.1 b). Anschließend legte man eine Intensitätsschwelle (Threshold) fest (s. Abb. 2.1 c), die für alle berechneten Bilder gleich war. Daraus

konnte dann der prozentuale Anteil des Bildes, der mit Plaques bedeckt war, berechnet werden.

2.8 Verhaltensbiologische Versuche

Die verhaltensbiologischen Untersuchungen wurden an 3- sowie 6- monatigen Tieren der Mauslinien 5xFAD- und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Tests wurden an aufeinanderfolgenden Tagen zur gleichen Zeit durchgeführt.

Die Versuche wurden in einem abgedunkelten Raum mit rotem Licht durchgeführt, bei konstanter Raumtemperatur, sowie gleichbleibenden Umgebungsgeräuschen.

Die Mäuse wurden in einem 12h-Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum.

Alle Versuche wurden unter sorgfältiger Berücksichtigung des Deutschen Gesetzes zum Tierschutz durchgeführt.

Nach jedem Versuchsdurchlauf mit einer Maus wurden die Testapparaturen sorgfältig mit Ethanol gereinigt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Geruch der vorherigen Mäuse zu verhindern.

2.8.1 Elevated Plus Maze

Dieser Test beruht auf 2 Phänomenen, die Mäuse zeigen. Zum einen zeigen Mäuse ein ängstliches Verhalten, wenn sie in offene Bereiche kommen; sie haben eine Tendenz, sich in geschützten Gebieten aufzuhalten. Zum anderen haben Mäuse ein natürliches Explorationsverhalten, d. h., dass sie unbekannte Bereiche erkunden wollen.

Der Elevated Plus Maze Test besteht aus einem Kreuz aus vier Armen, wobei zwei der Arme durch Plexiglaswände geschlossen sind (20 cm hoch) und zwei der Arme offen sind. Die Apparatur befindet sich 75 cm über dem Boden, sodass die Mäuse einen leeren Raum spüren, wenn sie sich auf den offenen Armen befinden.

Die Mäuse wurden zu Beginn des Versuchs in die Mitte der Apparatur gesetzt, wobei die Blickrichtung zu einem offenen Arm war. Dann konnten die Mäuse die Anlage 5 min frei erkunden. Eine Kamera zeichnete die Bewegungen auf und eine Software (Video Mot 2, Version 5.70, TSE-Deutschland) hat die Zeit in den offenen und geschlossenen Armen sowie in der Zentralregion gemessen.

Das Angstverhalten der Mäuse wurde ermittelt aus dem Verhältnis der Zeit, die sie in den offenen Armen verbrachten zu der gesamten Zeit.

2.8.2 Open Field Test

Dieser Test dient ebenfalls dazu, das Angstverhalten von Mäusen zu untersuchen. Dabei nutzt man das Phänomen, dass Mäuse es vermeiden, sich auf einer unbekanntem Freifläche ohne jegliche Deckung oder Rückzugsmöglichkeit aufzuhalten. Werden sie allerdings dieser Umgebung ausgesetzt, verhalten sie sich in einem unbekanntem freien Feld ängstlich und fluchtbereit.

Der Open Field Test misst die Aktivität in einer neuen Umgebung und kann so eine Kombination aus lokomotorischer Aktivität, Erkundungsverhalten, Neophobie, Agoraphobie und anderen Aspekten der Angst zusammen testen.

Der Versuchsapparat besteht aus einem Käfig aus Perspex-Wänden (50x50x38cm). An zwei Seiten der Wände sind 32 Infrarotsensoren angebracht, die vertikale Aktivität detektieren und lokalisieren können.

Auch dieser Versuch wird unter Rotlicht durchgeführt, die Umgebungslautstärke auf ein Minimum reduziert.

Die Fläche ist eingeteilt in einen zentralen Teil (20x20cm) und einen peripheren Teil (50x50cm), der die Bereiche an den Wänden kennzeichnet.

Die Mäuse wurden ins Zentrum des Feldes gesetzt, bevor der Versuch gestartet wurde. Die Mäuse konnten nun für 5 min das Feld frei erkunden. Dabei hat eine Kamera jede Bewegung der Maus registriert und eine Software (Video Mot 2, Version 5.70, TSE - Deutschland) ermittelte die Zeit, die sich das Tier im zentralen Bereich aufgehalten hat und die Zeit im peripheren Anteil der Apparatur. Außerdem wurde die Geschwindigkeit, mit der sich die Maus im Feld bewegte, sowie die lokomotorische Aktivität registriert.

Nach den 5 min wurden die Mäuse wieder in ihre Käfige gesetzt und die Versuchsapparatur mit Ethanol gereinigt, um Gerüche zu eliminieren.

Das Angstverhalten wurde nun daraus geschlossen, wie lange sich das Tier prozentual im Zentrum verglichen zur Peripherie aufgehalten hat.

2.9 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mithilfe der Software Graph Pad Prism (Version 4.03 für Windows, USA) durchgeführt. Die Analyse der Verhaltenstests sowie des Plaque-Loads wurde mit Hilfe einer univariaten Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt

von einem t-Test ausgewertet. Die Daten werden dabei als mittlere Standardabweichung +/- präsentiert. Die Signifikanzniveaus werden wie folgend definiert: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

3 Ergebnisse

3.1 Verhaltensversuche

Die Verhaltensversuche wurden mit 3 und 6 Monate alten, weiblichen Tieren des Genotyps 5xFAD und Wildtyp (Wt) durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

3.1.1 Elevated Plus Maze Test

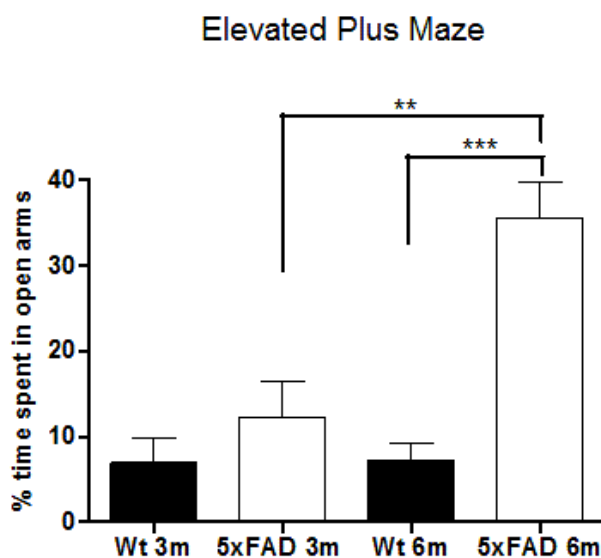


Abb. 3.1: Elevated Plus Maze Test

In diesem Versuch wurde die Angst darin gemessen, wie viel Zeit die Tiere in den offenen Armen verbrachten. Dies ist in der Abbildung 3.1 als prozentualer Anteil an der Gesamtzeit dargestellt worden. Die 5xFAD-Mäuse zeigten ein signifikant vermindertes Angstverhalten (viel Zeit in den offenen Armen) ab einem Alter von 6 Monaten. Im Gegensatz zu den APP/PS1KI-Mäusen, die, wie in der Einleitung berichtet, schon ab 2 Monaten ein stark vermindertes Angstverhalten zeigten (Cotel et al. 2010), waren die 5xFAD-Mäuse mit 3 Monaten in ihrem Verhalten noch nicht signifikant verändert zu den Wildtyptieren. Im Alter von 6 Monaten hielten sich die 5xFAD-Mäuse 33% der Zeit in den offenen Armen auf, wohingegen die Wildtyptiere nur 8% der Zeit dort verbrachten.

3.1.2 Open Field Test

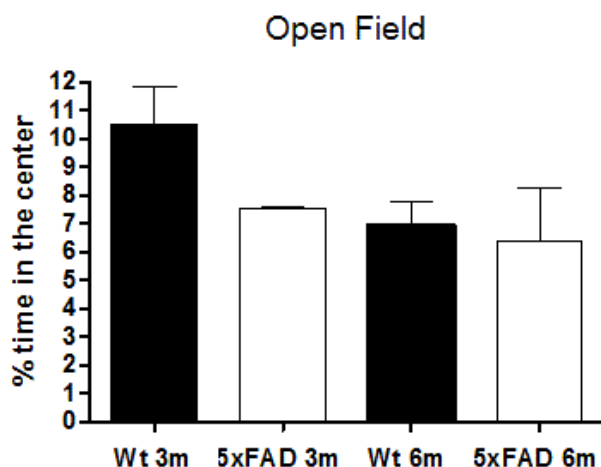


Abb. 3.2: Open Field Test

Der Open Field Test hat mehrere Parameter des Verhaltens gemessen. So wurde neben Lokomotion indirekt auch das Angstverhalten gemessen. In diesem Versuch zeigte sich, dass die 5xFAD-Mäuse weder mit 3 noch mit 6 Monaten einen signifikanten Unterschied zu den Wildtyptieren zeigen. Das Angstverhalten wurde in diesem Test aus der Zeit geschlossen, die sich die Tiere im Zentrum des Gebietes aufhielten. Man kann darauf schließen, dass weniger ängstliche Tiere mehr Zeit im Zentrum verbringen als die Wildtypiere. Hier konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zu den Wildtypmäusen festgestellt werden. Allerdings konnte man mit 6 Monaten schon einen Trend beobachten, dass die 5xFAD-Mäuse tendenziell etwas mehr Zeit im Zentrum verbrachten als die Wildtypiere. Allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant gewesen. Die dreimonatigen Wildtyp-Kontrolltiere verbrachten dagegen sehr viel Zeit im Zentrum, allerdings zeigten sie allgemein eine höhere Wegstrecke, sodass man vermuten muss, dass dieser Unterschied durch allgemein höhere Aktivität zustande gekommen ist.

3.2 Immunhistochemie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen dargestellt.

Diese wurden an Tieren der Linien APP/PS1KI 2+6 Monate, 5xFAD 3+6 Monate, sowie von 3xTg-Mäusen 7+18 Monate durchgeführt. Neben der Amygdala werden auch der Hippocampus sowie der Cortex dargestellt.

3.2.1 Untersuchungen der APP/PS1KI-Mäuse

3.2.1.1 APP-Expression

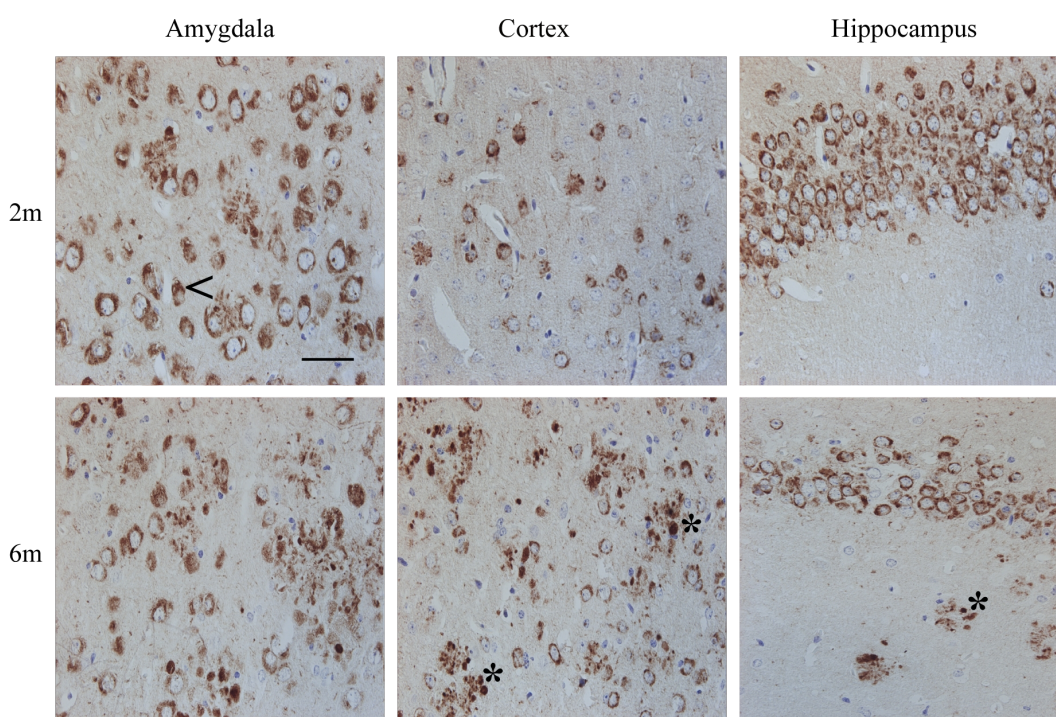


Abb. 3.3: APP-Expression in APP/PS1KI-Mäusen (hohe Expression (<)), verstärkte Akkumulation in Neuriten (*), Maßstabsbalken 50 μ m, Antikörper 23850)

Die APP-Expression ist mithilfe des Antikörpers 23850 dargestellt worden. Wie man auf der Abbildung 3.3 deutlich erkennen kann, war schon in zweimonatigen APP/PS1KI-Tieren eine extrem hohe APP Expression in der Amygdala zu erkennen. Mit 6 Monaten hat sich die APP Expression in den Zellen nicht erhöht. Allerdings konnte man eine Anhäufung von APP in den Axonen rund um die Plaques erkennen.

3.2.1.2 A β -Akkumulation

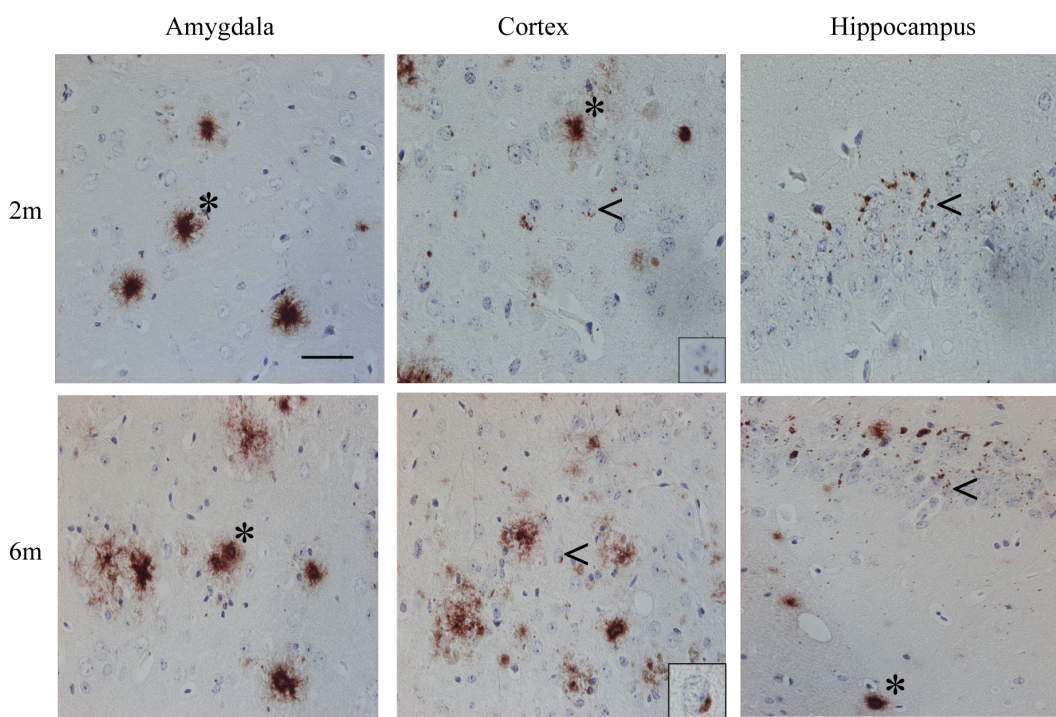


Abb. 3.4: A β -Ablagerungen in APP/PS1KI-Mäusen (Plaques in allen Bereichen (*), intrazelluläre Akkumulation im Cortex und Hippocampus (<), Maßstabsbalken 33 μ m, Antikörper A β (N))

Die A β -Akkumulation wurde mit verschiedenen Antikörpern gegen A β getestet. Als repräsentatives Beispiel ist hier die Färbung mit A β (N) gezeigt. Zu erkennen ist, dass die Menge der Plaques im Bereich der Amygdala und des Cortex mit 6 Monaten Alter zugenommen hat. Intraneurales A β war allerdings mit keinem Antikörper in der Amygdala zu finden. Betrachtet man aber den Hippocampus und den Cortex, so ist deutlich zu erkennen, dass intraneurales A β (<) in den APP/PS1KI-Mäusen eine große Rolle spielte. So war im CA1-Band des Hippocampus eine starke Akkumulation in den 2 Monate alten Tieren zu sehen. Aber auch in sechsmonatigen Tieren war A β nicht nur in Form von Plaques (*), sondern auch in den Zellen zu finden (<).

3.2.1.3 Axonale Degeneration

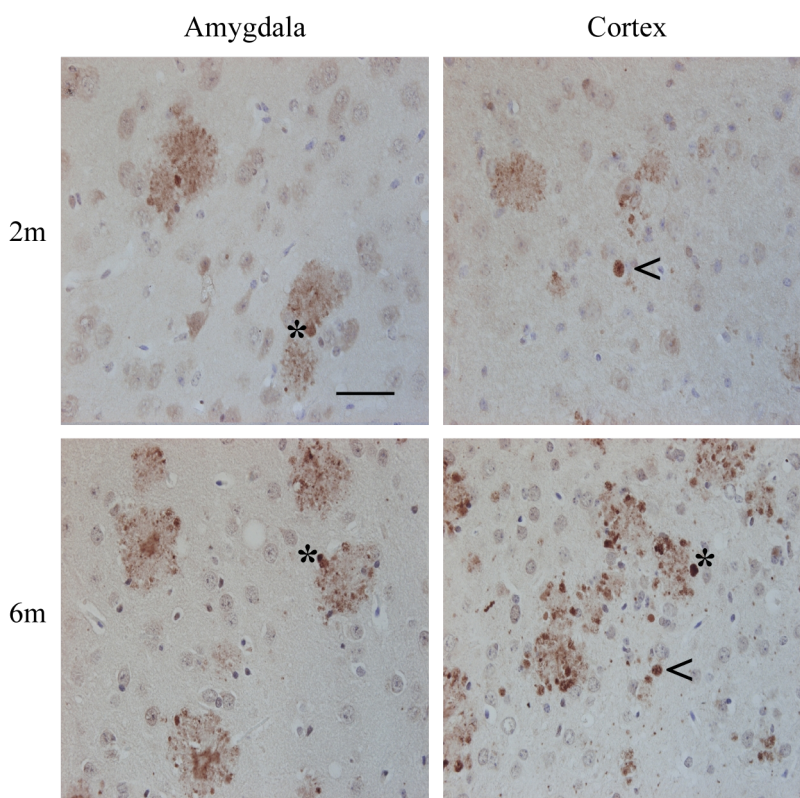


Abb. 3.5: Axonale Degeneration in APP/PS1KI-Mäusen, Antikörper Ubiquitin (in der Amygdala nur plaque-abhängige dystrophe Neuriten (), im Cortex auch plaque-unabhängig (<), Maßstabsbalken 50 μ m, Antikörper Anti-Ubiquitin)*

Um die axonale Degeneration zu untersuchen, bedient man sich des Antikörpers gegen Ubiquitin sowie APP als unspezifische Antikörper gegen Zellproteine.

Dystrophe Neuriten akkumulieren diese Proteine, sodass man diese gut als geschwollene Axone erkennen kann. In der Amygdala fanden sich dystrophe Neuriten (*), diese standen aber immer in direktem Kontakt mit den Plaques. Im Cortex dagegen konnte man auch von Plaques unabhängige Schwellungen der Axone erkennen (<).

3.2.2 Untersuchungen der 5xFAD-Mäuse

3.2.2.1 APP-Expression

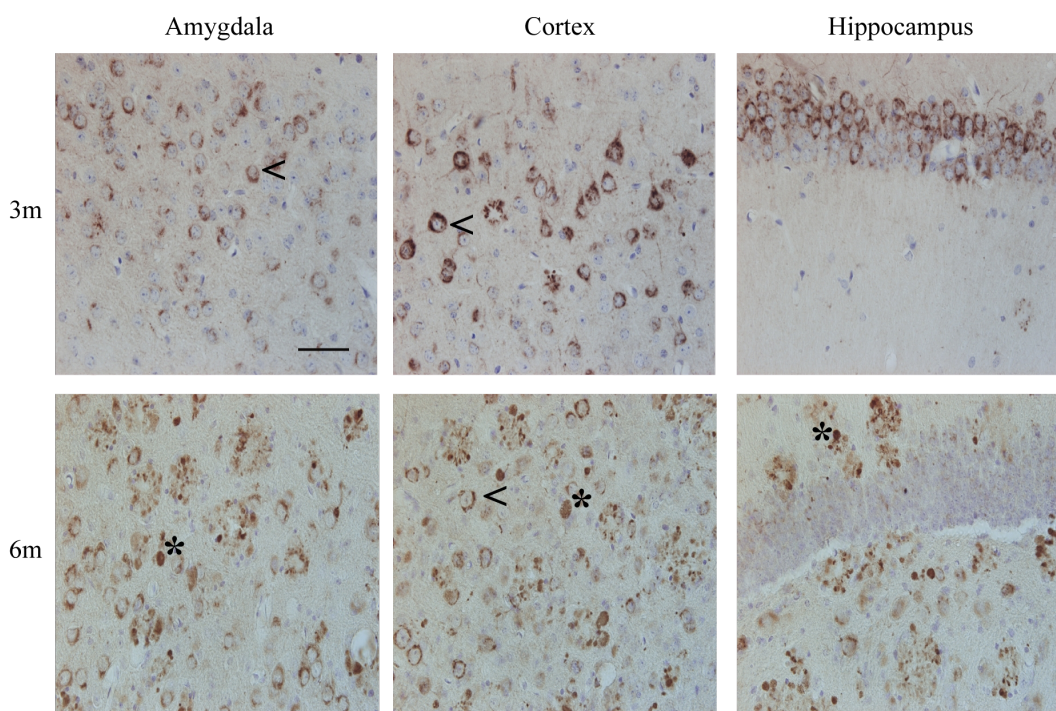
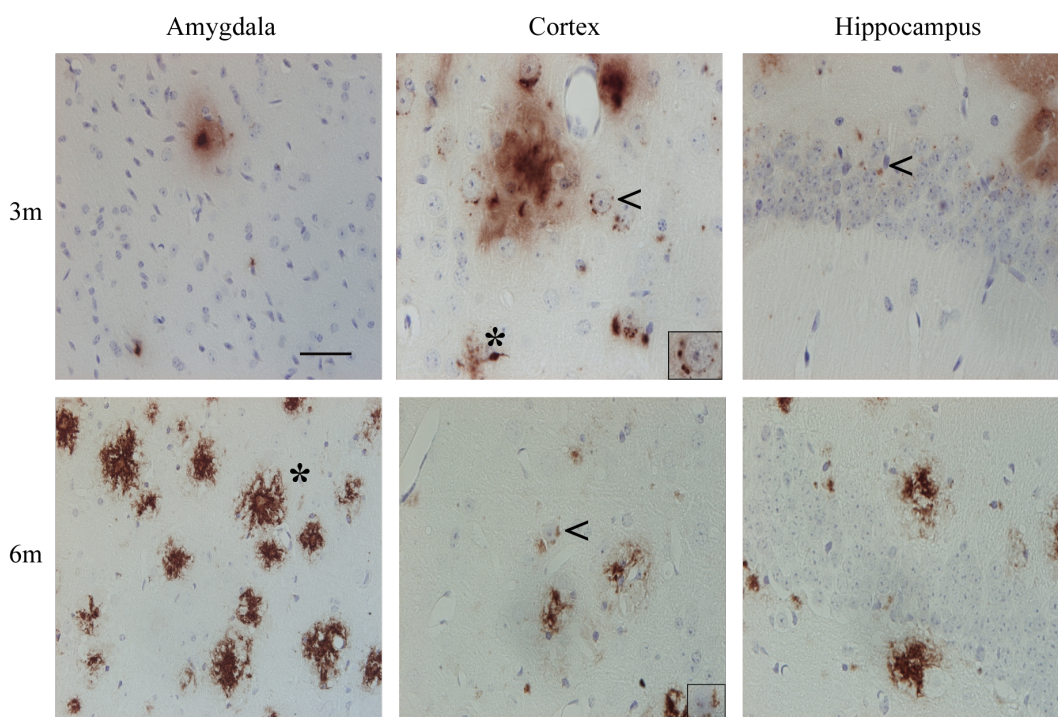


Abb. 3.6: APP-Expression in 5xFAD (intrazelluläre Akkumulation (<), auch in Neuriten (*), Maßstabsbalken 50 μ m, Antikörper 23850)

Mit dem Antikörper 23850 wurde auch bei den 5xFAD-Mäusen die APP-Expression in der Amygdala untersucht. Wie auf den Bildern zu sehen, waren in der Amygdala bei 3 Monaten wenig dystrophe Neuriten (*) um vereinzelte Plaques zu sehen. Mit 6 Monaten ist die Anzahl der Plaques sowohl in der Amygdala als auch im Cortex und Hippocampus deutlich gestiegen, und damit auch die Anzahl der dystrophen Neuriten. Die APP-Expression ist auch bei diesen Tieren sehr stark ausgeprägt gewesen (siehe <).

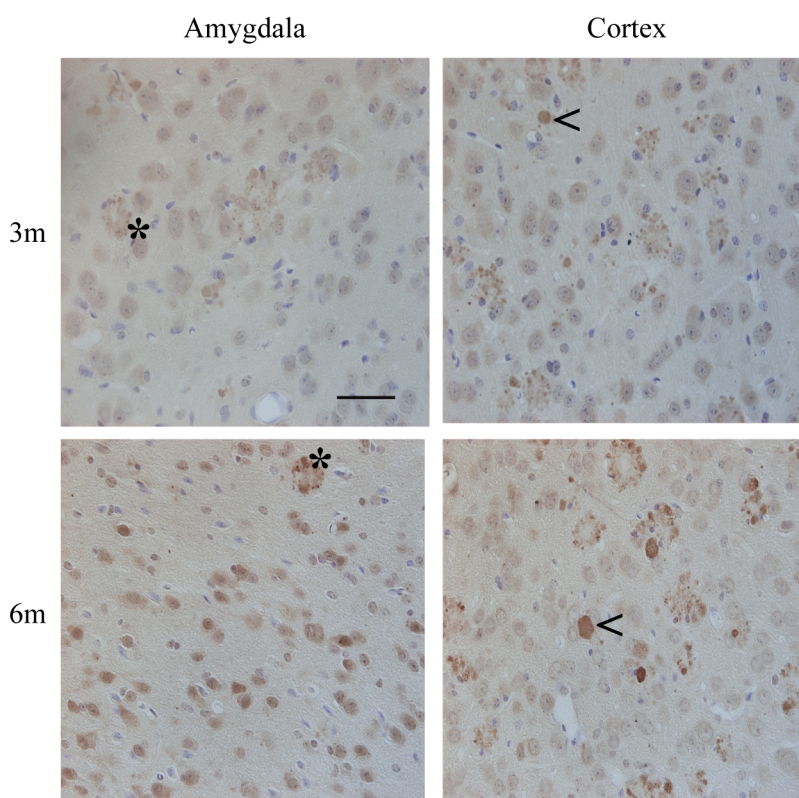
3.2.2.2 A β -Akkumulation



Auch hier wurde mit verschiedenen Antikörpern (A β (N), 2092, 4G8) die Akkumulation von A β in Zellen der Amygdala untersucht. Hier ist eine repräsentative Färbung mit A β (N) gezeigt.

Weder bei 3 noch bei 6 Monaten zeigte sich deutliches intrazelluläres A β in der Amygdala, obwohl dieses in diesen Tieren im Cortex und Hippocampus bis 6 Monate zu finden war. Die Pfeile (<) zeigen intrazelluläres A β -Protein. Festzustellen ist aber, dass in der Amygdala die Anzahl an Plaques von 3 auf 6 Monate stark angestiegen ist. Dies korreliert wiederum mit den Ergebnissen des Plaque Load (siehe 3.3.2).

3.2.2.3 Axonale Degeneration



Färbt man die Gehirne der 5xFAD-Mäuse wiederum mit Markern für axonale Degeneration, wie Ubiquitin, so konnte man erkennen, dass in der Amygdala keine solitären dystrophen Neuriten, sondern nur plaque-abhängige axonale Degeneration zu finden waren. Anders jedoch zeigte sich die Färbung des Cortex. Hier gab es sowohl Plaques und diese umgebende dystrophe Neuriten als auch solitäre, unabhängige Neuriten, die in ihrer Funktion gestört waren.

3.2.3 Untersuchungen der 3xTg-Mäuse

3.2.3.1 APP-Expression

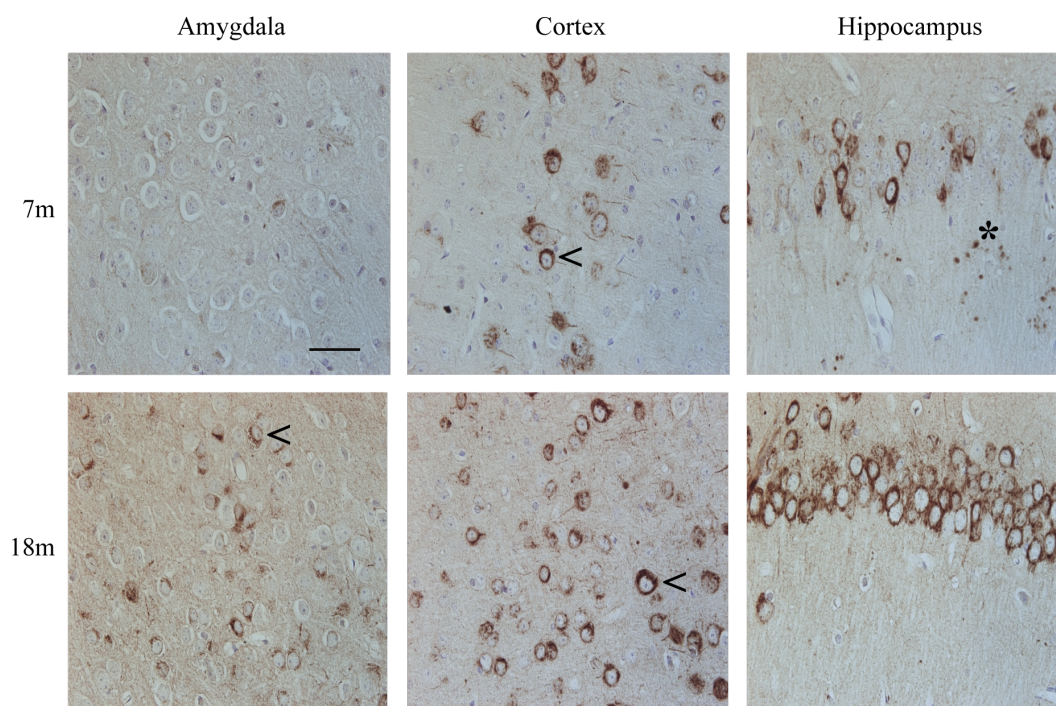
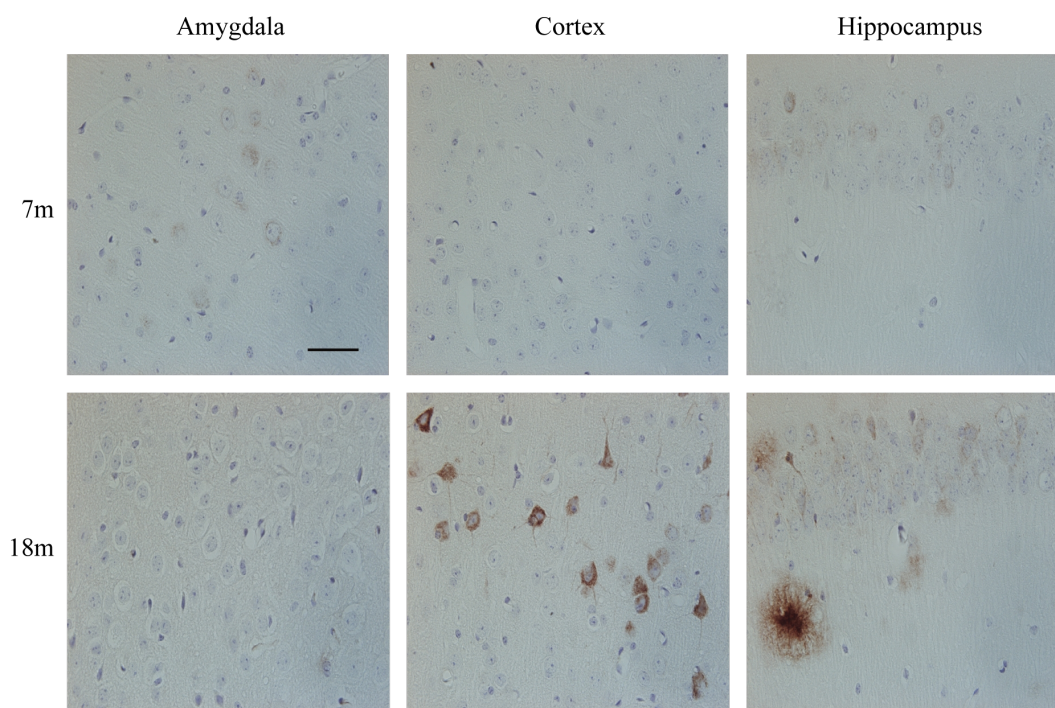


Abb. 3.9: APP-Expression in 3xTg (intrazelluläre Akkumulation (<), dystrophe Neuriten (*), Maßstabsbalken 50 μ m, Antikörper 23850)

Bei dieser Mauslinie zeigt sich deutlich, dass die Färbung gegen APP mit Zunahme des Alters von 7 auf 18 Monate deutlich intensiver geworden ist. Mit 7 Monaten war die Expression von APP in den Zellen der Amygdala noch nicht in allen Neuronen zu finden, wogegen die Neuronen der 18 Monate alten Tiere eine starke Anfärbung aufwiesen. Auch im Cortex und deutlich zu erkennen auch im Hippocampus nahm die Anzahl der angefärbten Neuronen zu. Darausfolgend kann man schließen, dass hier nicht ausschließlich die Expression von APP eine Rolle spielte, sondern eher eine Akkumulation von APP in den Zellen stattgefunden hat, aufgrund von Transportstörungen.

3.2.3.2 A β -Akkumulation

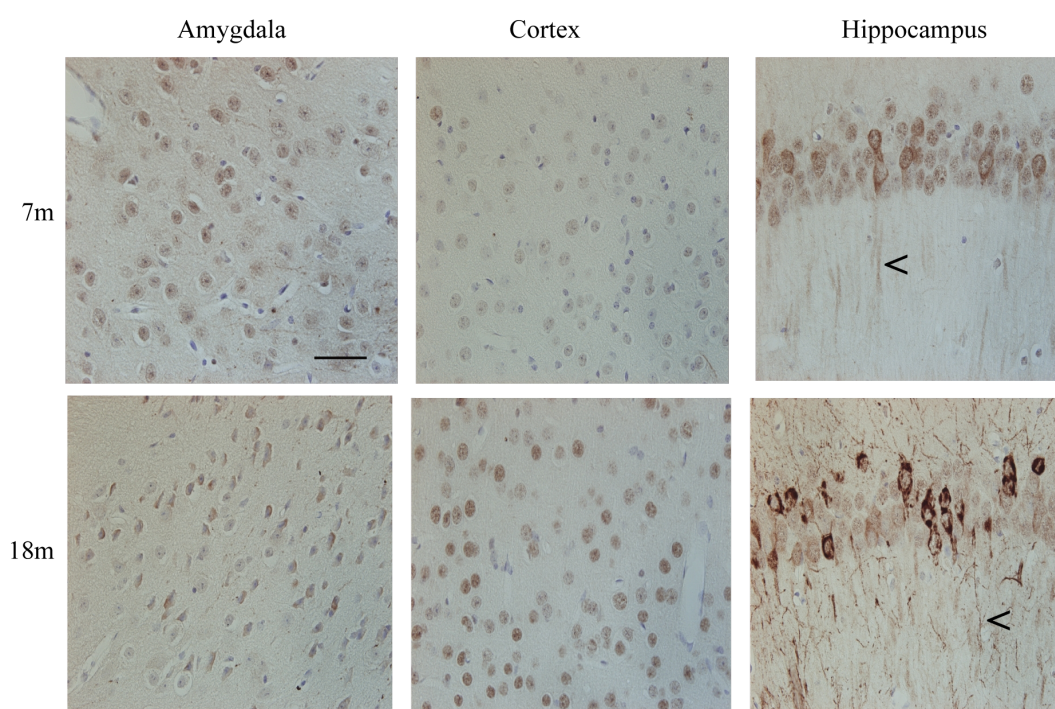


Färbte man die Hirnschnitte von 3xTg-Mäusen mit verschiedenen Antikörpern gegen A β (hier 4G8), so konnte man erkennen, dass in den Neuronen der Amygdala weder bei 7 noch bei 18 Monaten intrazelluläres A β zu finden war. Außerdem zeigten sich sowohl mit 7 als auch mit 18 Monaten sehr wenig extrazelluläre Plaques. Mit dem Antikörper 6E10, der wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, die Sequenz AS 1-17 des A β erkennt, konnte man jedoch eine Färbung in der Amygdala finden (siehe Kap. 3.2.4 Testung des 6E10 Antikörpers). Die Färbung der Zellen im Cortex ist sehr gleichmäßig, sodass es wahrscheinlich ist, dass hier auch APP mit angefärbt worden ist. Auch in dieser Färbung sieht man, dass die Intensität der Färbung von 7 auf 18 Monate stark zugenommen hat, sodass man auf ein Transportproblem schließen kann.

3.2.3.3 Axonale Degeneration

Mit mehreren Antikörpern gegen verschiedene Proteine, die Marker für axonale Degeneration darstellen (z. B. Ubiquitin, Neurofilamente, APP), konnte sich keine signifikante Degeneration von Neuriten nachweisen lassen.

3.2.3.4 Neurofibrilläre Ablagerungen



Mit dem Antikörper AT8 kann man hyperphosphoryliertes Tau nachweisen. In diesen Mäusen scheint die Pathologie der neurofibrillären Ablagerungen sehr stark zu sein, da die Färbung sehr ausgeprägt war. Man konnte außerdem sehen, dass auch dieses Phänomen im Alter stark zunahm, sodass man auch hier von einer Akkumulation und Transportstörung ausgehen kann. Dabei war die Zunahme der Pathologie vor allem im Bereich des Hippocampus zu beobachten, im Alter von 18 Monaten ließ sich in den Somata und auch im Bereich der Axone hyperphosphoryliertes Tau nachweisen. Dieses Ergebnis korreliert wiederum mit der Vermutung, dass ein Transportproblem in den Neuronen der 3xTg-Mäuse besteht.

3.2.4 Testung des 6E10-Antikörpers

Der 6E10 Antikörper ist ein häufig benutzter Antikörper, um A β nachzuweisen. Auch in vielen Publikationen über Experimente mit 3xTg-Mäusen wurde dieser Antikörper benutzt, um intraneuronales A β darzustellen.

3.2.4.1 DAB-Färbung

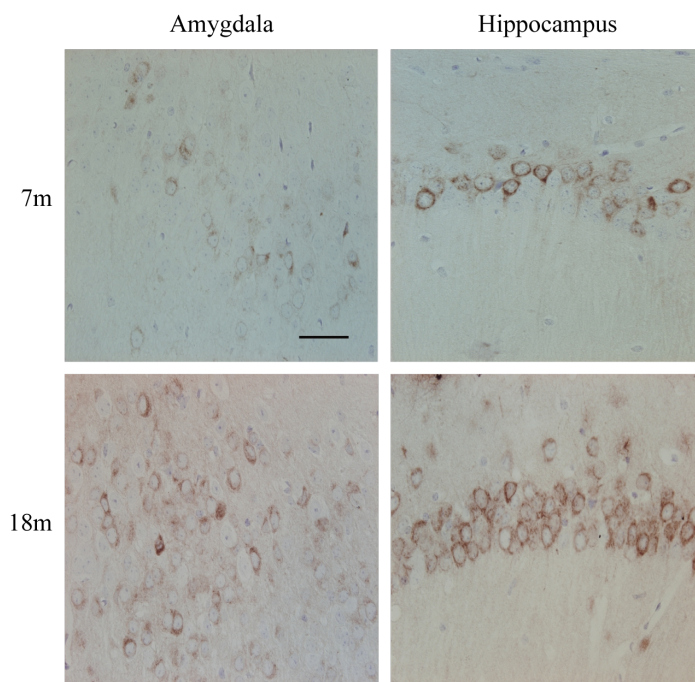
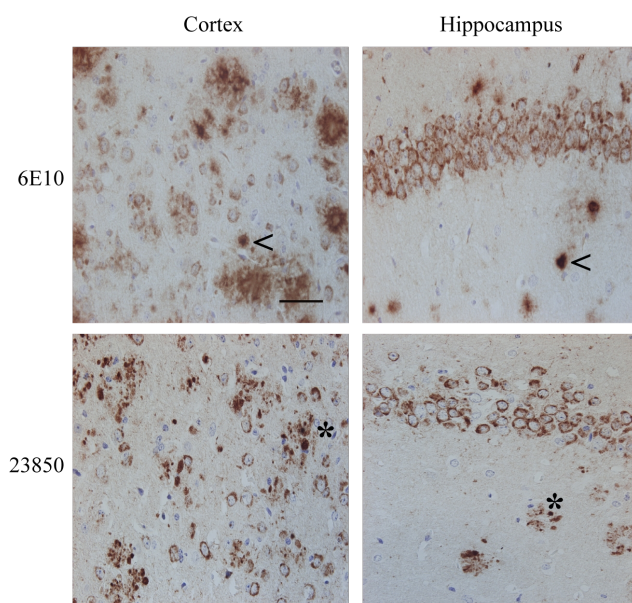


Abb. 3.12: 6E10-Färbung in 3xTg (Antikörper 6E10, Maßstabsbalken 50 μm)

In der immunhistochemischen DAB-Färbung lässt sich erkennen, dass mit diesem Antikörper auch in den Zellkörpern der Neurone in der Amygdala eine Färbung nachzuweisen war, die mit keinem anderen A β -Antikörper nachweisbar gewesen ist. Weiterhin sieht man deutlich, dass die Färbung nicht punktuell, sondern sehr gleichmäßig im gesamten Soma zu erkennen ist.

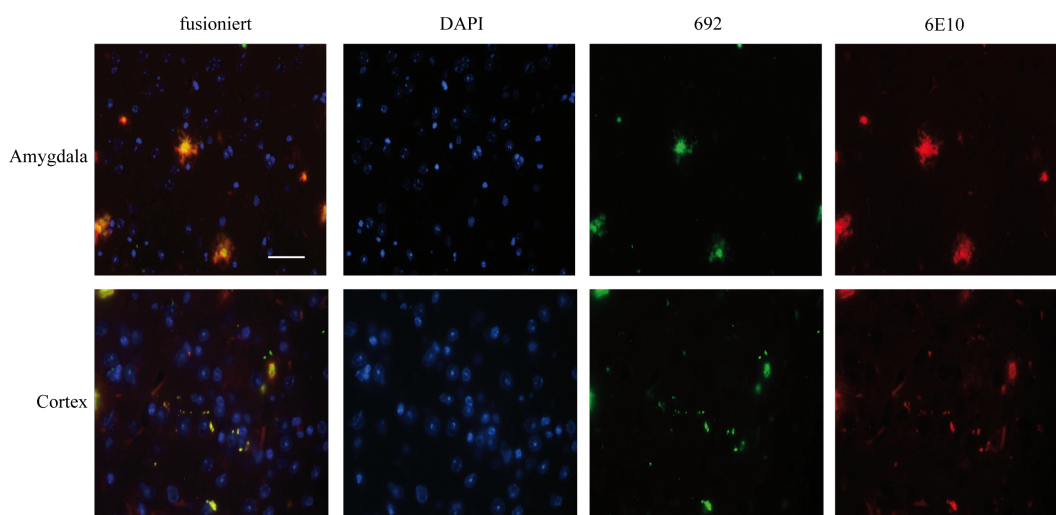


Vergleicht man nun eine APP-Färbung mit der 6E10-Färbung (s. Abb. 3.13), so kann man sehr deutlich erkennen, dass die Anfärbung der Somata durch den Antikörper 6E10 der Färbung des Antikörpers 23850 gegen das Protein APP sehr ähnlich sieht. Das Soma ist bei beiden Färbungen sehr gleichmäßig angefärbt. Allerdings fällt auf, dass der Antikörper 6E10 vor allem das Zentrum der extrazellulären Plaques anfärbt (siehe <), wohingegen der Antikörper 23850 vor allem die dystrophen Neuriten um die Plaques herum angefärbt hat (siehe *). Damit kann man sagen, dass der Antikörper 6E10 sowohl A β als auch APP färbt.

Außerdem kann man in den Schnitten, die mit dem Antikörper 6E10 inkubiert worden sind, erkennen, dass auch die Zellen des Gyrus dentatus eine gleichmäßige Färbung aufweisen (siehe Anhang 7.3). Im Gyrus dentatus konnte bisher in keinem Mausmodell intraneuronales A β gefunden werden, APP-Expression ist dort allerdings vorhanden (Cotel et al. 2008).

3.2.4.2 Doppel-Fluoreszenzfärbung

Färbt man Gehirnschnitte mit 6E10 und 692 in einer Doppelfärbung, so kann man erkennen, welche Bereiche von beiden Antikörpern angefärbt worden sind.

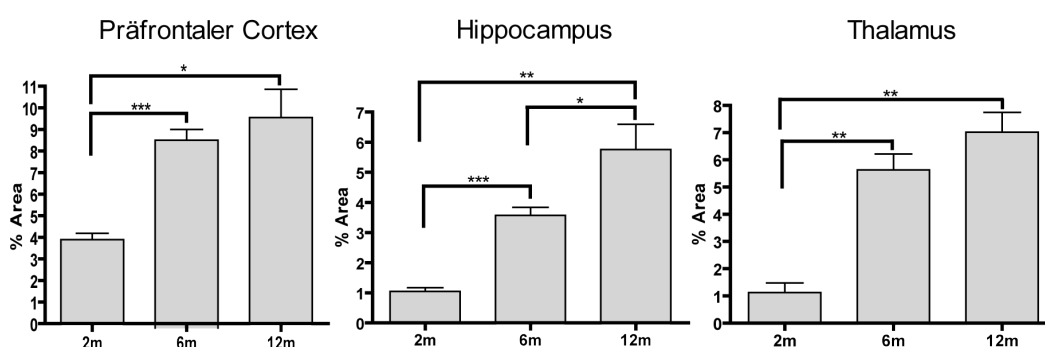


Dargestellt sind die Bereiche Cortex und Amygdala. Auf den fusionierten Bildern kann man erkennen, dass die Plaques von beiden Antikörpern angefärbt wurden. Der 6E10 Antikörper färbte allerdings einen größeren Bereich der Plaques an, unter anderem auch den äußeren Rand. Dies deutet darauf hin, dass dieser Antikörper nicht nur A β , sondern auch einen gewissen Teil APP erkennt und anfärbt. Allerdings ist dieser Effekt in der DAB-Färbung wesentlich stärker ausgeprägt gewesen.

3.3 Quantitative A β -Plaque-Auswertung

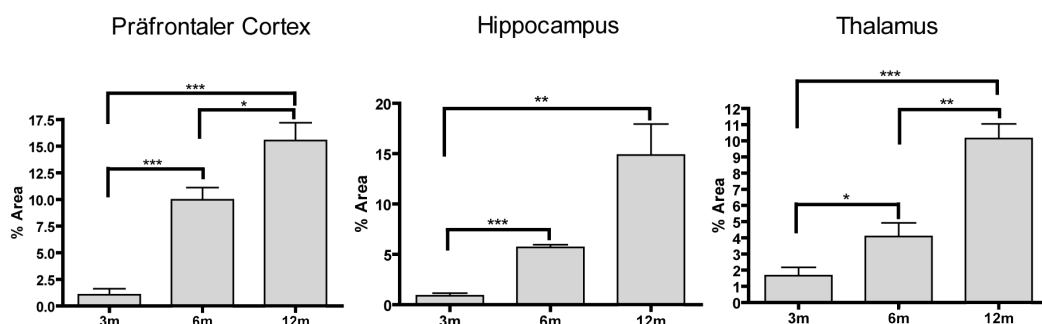
Um die Plaques zu quantifizieren, sind die Schnitte mit einem Antikörper gegen A β gefärbt worden und wie im Kapitel 2 erwähnt, mit der Software ImageJ bearbeitet worden. Dargestellt sind die Ergebnisse der Bereiche Präfrontaler Cortex, Hippocampus und Thalamus als Hauptprojektionsorte zur und von der Amygdala. Dabei sind bei den APP/PS1KI-Mäusen die Alter 2, 6 und 12 Monate untersucht worden (5xFAD: 3, 6, 12 Monate).

3.3.1 APP/PS1KI-Mäuse



Betrachtet man die Menge an A β im präfrontalen Cortex, so erkennt man, dass sich die Menge an A β von 4% bei 2 Monaten auf 8% bei 6 Monaten verdoppelte. Zwischen 6 und 12 Monaten dagegen veränderte sich die Menge nur noch geringfügig. Dies spricht dafür, dass ab 6 Monaten keine signifikante Plaquebildung mehr stattgefunden hat. Im Hippocampus zeigt sich ein ähnliches Bild. Von anfänglich 1% bedeckter Fläche stieg die Menge an A β mit 6 Monaten signifikant auf 3,5% an. Allerdings zeigte sich hier eine weitere Steigerung bis zum Alter von 12 Monaten auf 5,5%. Die Varianz war hier aber sehr hoch. Der Thalamus zeigte ebenfalls, dass zwischen 2 und 6 Monaten eine starke Steigerung der A β -Menge stattfindet, wogegen ab 6 Monaten nur noch geringe Änderungen auftraten.

3.3.2 5xFAD-Mäuse



Auch bei dieser Mauslinie konnte man einen starken Anstieg der A β -Menge beobachten. Der Plaque-Load des Präfrontalen Cortex zeigt, dass von 3 zu 6 Monaten eine Zunahme von 1% auf 10% bestand. Bis zu 12 Monaten stieg die Menge dann nur noch um 5%. Beim Hippocampus dagegen stieg die prozentual mit A β bedeckte Fläche kontinuierlich stark an. Und auch im Thalamus zeigte sich ein ähnliches Bild, sodass man davon ausgehen kann, dass in dieser Mauslinie kontinuierlich Plaques entstehen und diese auch im höheren Alter von 12 Monaten nicht abnehmen oder stagnieren.

3.4 Synapsenquantifizierung

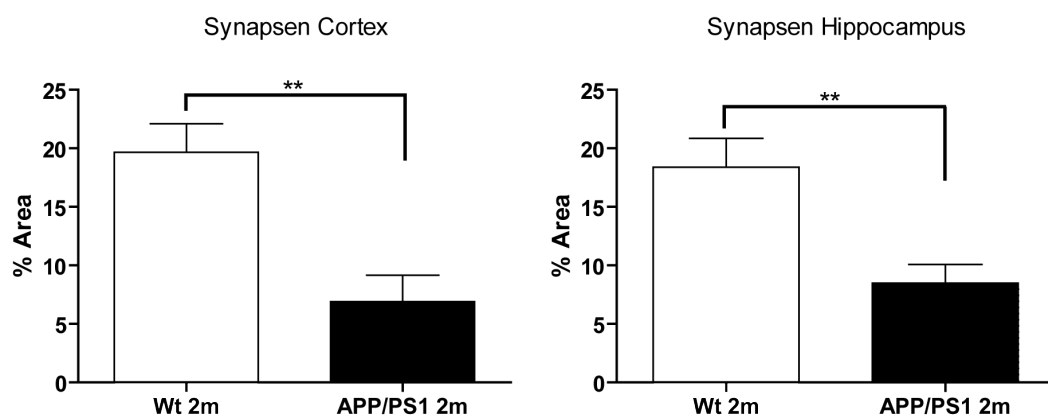


Abb. 3.17: Relative Synapsenmenge in APP/PS1KI vs. Wildtyp

Um die Synapsen quantifizieren zu können, wurde eine Fluoreszenzfärbung mit Synaptophysin durchgeführt. Die aufgenommenen Bilder wurden dann mit der Software ImageJ bearbeitet, sodass man die fluoreszierenden Signale als Threshold

berechnen konnte. Somit hat man ebenfalls eine von Synapsen bedeckte Fläche berechnet, die mit der Synapsenanzahl korreliert. Betrachtet man den Cortex, so konnte man einen starken Verlust an Synapsen schon bei 2 Monate alten APP/PS1KI-Tieren feststellen. Während die Wildtyptiere eine Fläche von ca. 20% mit Synaptophysin-Signal bedeckten, war bei den transgenen Tieren nur eine Fläche von 7,5% bedeckt. Ebenfalls eine starke Verminderung der Synapsen war auch im Hippocampus sichtbar. Im Vergleich zu den Wildtyptieren konnte man bei den APP/PS1KI-Mäusen einen Verlust von ca. 10% Synapsen erkennen. Da diese beiden Regionen sehr wichtige Projektionsstellen zur Amygdala sind, kann man aus diesen Ergebnissen auch die Defizite im Bezug auf das Angstverhalten erklären.

4 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob es im Gehirn transgener Alzheimer-Mäuse eine neuropathologische Korrelation zum gezeigten Angstverhalten gibt. Außerdem war die Frage, ob auch 5xFAD-Mäuse ein verändertes Angstverhalten zeigen. Die Fragestellung hat sich aus der Publikation von España et al. (2009) ergeben. In dieser Publikation wurde, wie im Kapitel 1 schon erwähnt, beschrieben, dass die 3xTg-Mäuse ein erhöhtes Angstverhalten zeigen. Dieses wurde mithilfe der dort beobachteten Veränderungen in der Amygdala erklärt, die neuropathologisch untersucht worden ist und in der intrazelluläres A β gefunden wurde. Diese Hypothese wurde zum Ausgangspunkt dieser Arbeit gewählt, da sowohl im APP/PS1KI-Mausmodell als auch im 5xFAD-Modell intrazelluläres A β als ein Hauptfaktor der Pathogenese gesehen wird (Christensen et al. 2008 ; Oakley et al. 2006). Die Frage war nun, ob auch in diesen Mauslinien intrazelluläres A β in der Amygdala ein Auslöser für das gezeigte verringerte Angstverhalten sein kann.

Die in dieser Arbeit verhaltensbiologisch untersuchten 5xFAD-Mäuse zeigten, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Gruppe España et al. (2009), gegensätzliches Angstverhalten.

Wie im Kapitel Ergebnisse zu sehen ist, zeigen die 5xFAD-Mäuse ein vermindertes Angstverhalten verglichen mit gleichaltrigen Wildtyptieren. Verbrachten 3 Monate alte 5xFAD-Mäuse noch keine signifikant längere Zeit in den offenen Armen des Elevated Plus Maze, so zeigten sie mit 6 Monaten jedoch ein signifikant anderes Verhalten als die Wildtyp-Tiere. Mit 33% der Zeit in den offenen Armen haben diese Tiere ein geringeres Angstverhalten als die Wildtyp-Tiere mit 8% der Zeit in den offenen Armen. Dagegen konnte im Open Field Test kein eindeutiges Ergebnis gezeigt werden. Zwischen den 3- und 6- monatigen Tieren konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, bezogen auf die Zeit, die sie sich im Zentrum der Versuchsanordnung aufgehalten haben. Dabei ist allerdings festzuhalten, dass der Open Field Test kein spezifischer Verhaltenstest für Angstverhalten ist. Dabei werden auch die Lokomotion sowie das Rearing-Verhalten gemessen und erfasst. In einer Studie von Jawhar et al. (2010) wurde ebenfalls das Verhalten von 5xFAD-Mäusen im Open Field Test getestet. Erst ab einem Alter von 12 Monaten hielten

sich die 5xFAD-Mäuse signifikant länger im Zentrum auf als die Wildtyp-Mäuse (Jawhar et al. 2010).

Dass dieser Unterschied zwischen Elevated Plus Maze und Open Field besteht, kann damit erklärt werden, dass der Open Field Test eine geringere Sensitivität in Bezug auf das Angstverhalten zeigt als der Elevated Plus Maze Test. So ist eine Versuchsanordnung, die sich 75 cm über dem Boden befindet, vermutlich deutlich abschreckender als eine helle Fläche auf dem Boden. Da die Ergebnisse im Elevated Plus Maze Test aber sehr aussagekräftig ($p < 0.001$) sind, und ab 12 Monaten auch im Open Field Test ein verändertes Verhalten zu den Wildtyp-Tieren besteht, kann man sagen, dass die 5xFAD-Mäuse altersabhängig ein geringeres Angstverhalten als Kontrolltiere zeigen.

Dieses Ergebnis passt wiederum zu den Ergebnissen von Cotel et al. 2010, die das Angstverhalten bei APP/PS1KI-Mäusen untersuchte. Dabei ist auch eine vermehrte Zeit in den offenen Armen im Elevated Plus Maze beobachtet worden.

Das unterschiedliche Angstverhalten zwischen den 3xTg- und APP/PS1KI- und 5xFAD-Tieren lässt sich zum Teil durch die unterschiedlichen genetischen Voraussetzungen erklären. So hat das Mausmodell 3xTg eine PS1-Mutation (M146V), die Schwedisch-APP-Mutation (K670N/M671L) und eine Tau-Mutation (P301L) (Oddo et al. 2003). Die anderen beiden Tiermodelle haben zwar ebenfalls Präsenilin- und APP-Mutationen, jedoch sind diese an anderen Stellen im Genom und beide Modelle haben keine Tau-Mutation. Diese Tau Mutation kann dazu führen, dass ein gesteigertes Angstverhalten auftritt, da bei neuropathologischen Untersuchungen der Amygdala eine Akkumulation von Tau-Protein in den Zellkörpern der Amygdala gefunden wurde (s. Kapitel 3.2.3.4).

Neben den verhaltensbiologischen Untersuchungen standen die neuropathologischen Untersuchungen der Amygdala im Vordergrund. Dabei sollte herausgefunden werden, ob intrazelluläres A β dafür verantwortlich sein kann, dass das Angstverhalten bei verschiedenen transgenen Alzheimer-Mäusen verändert ist. Intrazelluläres A β wird als ein sehr wichtiger Faktor der Pathogenese von M. Alzheimer angesehen. So wurde von Wirths et al. 2004 eine modifizierte Amyloid-Hypothese entwickelt, die dieser Rolle des intrazellulären A β gerecht wird (Wirths et al. 2004). Dabei wird als initialer Faktor der Pathogenese die Entstehung von intrazellulärem A β angesehen, das zu synaptischer und neuronaler Dysfunktion und anschließendem Neuronenverlust führt. Die extrazellulären Plaques werden nicht

als Ursache der Krankheitsentstehung angesehen. Dafür gibt es mehrere Anhaltspunkte. Zum einen korreliert die Menge an extrazellulären Plaques nicht mit dem Stadium der Erkrankung (Arnold et al. 1991). Wie schon in der Einleitung erwähnt, traten auch bei Patienten mit Down-Syndrom nachweisbare Mengen an intrazellulärem A β schon in sehr jungem Alter auf und diese Mengen nahmen mit der Menge an extrazellulären Plaques ab (Mori et al. 2002). Allerdings zeigten auch einige Studien konträre Ergebnisse. So zeigten Wegiel et al. 2007, dass bei Patienten mit Down-Syndrom als auch bei Kontrollpersonen intraneuronales A β kontinuierlich über das ganze Leben vorhanden ist (Wegiel et al. 2007).

Da durch viele Untersuchungen aber gezeigt werden konnte, dass intrazelluläres A β eine große Rolle spielt, ist auch in dieser Arbeit vorrangig nach nachweisbarem intrazellulärem A β in der Amygdala gesucht worden. Dabei ist mit mehreren Antikörpern gegen A β gefärbt worden, sodass verhindert werden konnte, dass ein einzelner Antikörper eventuell nicht sensitiv genug ist und deshalb eventuell keine Färbung auftritt. Wie im Kapitel Material und Methoden zu sehen ist, binden die verwendeten Antikörper an verschiedene Bereiche des A β . Dabei kann man sehen, dass einige Antikörper auch APP mit anfärben können, wie z.B. der Antikörper 6E10. Ergebnisse, die mit diesem Antikörper produziert werden, sind also nicht spezifisch für A β . In dieser Arbeit konnte weder bei APP/PS1KI-, noch bei 5xFAD-, noch bei 3xTg-Mäusen eine Akkumulation von intrazellulärem A β in der Amygdala gefunden werden. APP war zwar bei allen Mausmodellen in den Zellkörpern der Amygdala zu finden, aber das Spaltprodukt der γ -Sekretase (A β) konnte mit keinem Antikörper nachgewiesen werden. Auch die Menge an extrazellulären Plaques war gering, sodass man in der Amygdala selbst keine immunhistochemisch nachweisbare Ursache für das Angstverhalten finden konnte. España et al. haben in ihren Untersuchungen vermehrte Ansammlung von intrazellulärem A β in der Amygdala gefunden. Die unterschiedlichen Ergebnisse können damit zusammenhängen, dass unterschiedlich sensitive Antikörper genutzt worden sind. So wurde zum Teil der Antikörper 6E10 zur Detektion von A β genutzt (España et al. 2009). Dadurch kann es zu einem falsch positiven Ergebnis kommen. Allerdings ist auch möglich, dass unterschiedliche Regionen der Amygdala untersucht worden sind. Auch in anderen Studien, die mit den tripel-transgenen Mäusen durchgeführt worden sind, ist häufig der Antikörper 6E10 verwendet worden, um Ansammlungen von intrazellulärem A β nachzuweisen. So zeigten Oddo et al. 2003 die Co-

Lokalisation von A β und Tau mithilfe dieses Antikörpers (Oddo et al. 2003). Das dort gezeigte Bild zeigt einen homogen angefärbten Zellkörper, dies steht im Widerspruch zur Akkumulation von intrazellulärem A β , da dieses sich vor allem punktuell anfärben lässt (Christensen et al. 2008). Auch bei neuropathologischen Untersuchungen des Hippocampus wurde dieser Antikörper verwendet (Oddo et al. 2006), auch hier entspricht das Bild nicht einem typischen Bild des intrazellulärem A β , die homogene Färbung spricht eher für eine Färbung von APP. Auch in dieser Arbeit wurden einige Schnitte mit dem Antikörper 6E10 gefärbt, um zu überprüfen, ob sich damit die Ergebnisse von España et al. reproduzieren lassen. Wie im Kapitel Ergebnisse gezeigt, ist in der Amygdala der 3xTg-Mäuse eine intrazelluläre Färbung aufgetreten. Aber auch hier zeigte sich die Färbung homogen über das gesamte Soma verteilt, sodass man nicht davon ausgehen kann, dass dies ein Nachweis von A β ist. Auch Aho et al. konnten zeigen, dass die Verwendung vom Antikörper 6E10 nicht spezifisch für A β ist, sondern auch APP angefärbt wird. Hier wurde sowohl mit dem 6E10-Antikörper als auch mit dem APP-Antikörper 22C11 dieselbe Zelle angefärbt. Der Antikörper 6E10 erkennt die Aminosäuren 1-17 vom Protein A β , diese Sequenz kann auch im noch nicht- oder anders-sequenzierten APP angefärbt werden, sodass man nicht zwischen APP, A β , oder APP-Spaltprodukten unterscheiden kann (Aho et al. 2010).

Da im Bereich der Amygdala keine direkte Korrelation des Angstverhaltens mit der Neuropathologie gefunden werden konnte, wurden die Untersuchungen auf die Projektionsgebiete ausgeweitet. So wurden im Hippocampus, Thalamus und im Präfrontalen Cortex Plaque-Loads berechnet, sowie eine Synapsenquantifizierung durchgeführt. Der Plaque-Load ergab, dass in den Gebieten, die zu der Amygdala viele Afferenzen abgeben, eine große Menge an Plaques vorhanden ist. So ist der Präfrontale Cortex in den APP/PS1KI-Mäusen schon mit 2 Monaten zu 4% mit Plaques bedeckt. Diese Menge verdoppelt sich bis zum 6. Lebensmonat. Auch im Hippocampus und im Thalamus sind signifikante Steigerungen der Plaque-Menge innerhalb von 4 Monaten erkennbar. Es ist wahrscheinlich, dass extrazelluläre Plaques erst dadurch entstehen, dass zunächst intrazelluläres A β gebildet worden ist (Wirths et al. 2002). Auch in den hier gezeigten immunhistochemischen Färbungen konnte in den Bereichen Cortex und Hippocampus bei 2 Monaten eine relativ große Menge an intrazellulärem A β nachgewiesen werden, die allerdings mit 6 Monaten schon deutlich abgenommen hatte. Proportional dazu stieg aber die Menge der

Plaques an (s. Kap. 3.3.1). Dass bei den APP/PS1KI-Mäusen bereits mit 2 Monaten ein signifikant geringeres Angstverhalten als bei den Wildtyptieren festzustellen ist, kann also damit zusammenhängen, dass in den auf die Amygdala projizierenden Gebieten viel intrazelluläres A β die normale neuronale und synaptische Funktion stört. Auch bei den 5xFAD-Mäusen, die ja ebenfalls ein verringertes Angstverhalten ab dem Alter von 6 Monaten zeigen, kann man feststellen, dass die Menge an Plaques im Präfrontalen Cortex, Hippocampus und Thalamus im Alter von 6 Monaten (kritisches Alter beim Angstverhalten bei 5xFAD-Mäusen) in etwa der Menge an Plaques der APP/PS1KI-Mäuse von 2 Monaten entspricht. Dies könnte eine Erklärung für das spätere Eintreten des verminderten Angstverhaltens bei den 5xFAD-Mäusen sein. Allerdings ist es auch wahrscheinlich, dass durch die große Menge an Plaques viele Neuriten in der Umgebung geschädigt werden. Diese Neuriten stehen eventuell auch mit der Amygdala in Verbindung. Wenn diese Verbindung nun unterbrochen wird, kann keine strukturierte Antwort auf einen emotionalen Reiz mehr produziert werden.

Auch die Ergebnisse der Synapsenquantifizierung korrelieren mit den verhaltensbiologischen Ergebnissen von Cotel et al. 2010. Es konnte ein signifikanter Synapsen-Verlust bereits im Alter von 2 Monaten in den APP/PS1KI-Mäusen beobachtet werden. Da Synapsen für das Nervensystem extrem wichtig sind, ist zu verstehen, dass das normale Angstverhalten nicht mehr gezeigt werden kann. Allerdings ist hierbei anzumerken, dass das Mausmodell APP/PS1KI ein sehr stark phänotypisch betroffenes Modell ist, dies zeigt sich auch bei motorischen und kognitiven Leistungen, die schon sehr früh abfallen (Cotel et al. 2010). Deswegen ist es nicht möglich, die hier dargestellten Ergebnisse direkt auf alle existenten Alzheimer-Tiermodelle oder auf den Menschen zu übertragen. Alle Alzheimer-Mausmodelle basieren auf den genetischen Veränderungen der Familiären Alzheimer-Demenz, die autosomal-dominant vererbt wird. Diese machen allerdings nur einen sehr geringen Teil aller Alzheimer-Fälle aus, da mehr als 90% der Fälle sporadisch auftreten (Blennow et al. 2006). Somit kann man nicht genau sagen, inwieweit sich die Ergebnisse der Tierexperimente mit dem Krankheitsbild der sporadischen Alzheimer-Demenz vergleichen lassen.

Was das intrazelluläre A β betrifft, so gibt es jedoch Studien, die belegen, dass auch in Alzheimer-Patienten intrazelluläres A β in den Nervenzellen gefunden werden kann (Christensen et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in dieser Studie belegt worden ist, dass das Angstverhalten bei Alzheimer-transgenen Mäusen verändert ist. So wurde bei den verhaltensbiologisch und neuropathologisch untersuchten Mäusen 5xFAD und neuropathologisch untersuchten APP/PS1KI ein vermindertes Angstverhalten gefunden. Eine Erklärung für dieses Verhalten kann mit dieser durchgeführten Studie nicht in der Amygdala selbst, sondern in den Projektionsgebieten gefunden werden. In der Amygdala wurde kein intrazelluläres A β nachgewiesen. In der Amygdala zeigte sich eine hohe APP-Expression und eine mäßige Plaque-Menge. Es konnte auch keine besonders starke axonale Degeneration gefunden werden. In den Projektionsgebieten der Amygdala dagegen war die Menge an intrazellulärem A β hoch. So konnte sowohl im Cortex als auch im Hippocampus intraneuronales A β nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei APP/PS1KI-Mäusen schon ab 2 Monaten ein signifikanter Synapsen-Verlust im Cortex und Hippocampus besteht. Daraus lässt sich schließen, dass die interneuronale Kommunikation zwischen Neuronen der Amygdala und den Neuronen des Cortex und Hippocampus gestört ist, sodass das veränderte Angstverhalten auch damit erklärbar wird.

5 Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit ist eine primäre Form der Demenz und entsteht durch neurodegenerative Prozesse, deren Ätiologie bisher noch nicht vollständig bekannt ist. Neuropathologische Charakteristika sind dabei Amyloid- β -Plaques und neurofibrilläre Tangles. Transgene Mausmodelle, die verschiedene Mutationen der Familiären Alzheimer-Demenz (FAD) beinhalten, werden oft zur Erforschung der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit verwendet.

Es ist beobachtet worden, dass bei Alzheimer-Patienten eine erhöhte Prävalenz von Angststörungen und Depressionen besteht, sodass auch in transgenen Mausmodellen untersucht wird, ob das Angstverhalten verändert ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gehirne von 5xFAD-, APP/PS1KI- sowie 3xTg-Mäusen verschiedener Altersgruppen auf mögliche neuropathologische Korrelation ihres Angstverhaltens untersucht. Des Weiteren wurden verhaltensbiologische Untersuchungen zum Angstverhalten bei 5xFAD-Mäusen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Angstverhalten bei 5xFAD-Mäusen mit 6 Monaten im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant erniedrigt ist.

Der Schwerpunkt der neuropathologischen Untersuchungen lag auf dem Nachweis von intrazellulärem A β , das in vielen Studien als ein Hauptfaktor der Pathogenese des M. Alzheimer angesehen wird.

Da das Angstverhalten eine komplexe Reaktion des Organismus auf bestimmte Reize ist, wurden die Amygdala, der Cortex sowie der Hippocampus neuropathologisch untersucht, da diese Bereiche mit der Angstreaktion in Verbindung gebracht werden.

In der Amygdala ließ sich bei keinem der untersuchten Mausmodelle intrazelluläres A β nachweisen. Allerdings zeigte sich eine deutlich sichtbare Akkumulation von intrazellulärem A β in den Projektionsgebieten der Amygdala (Cortex und Hippocampus), sodass vermutet werden kann, dass durch diese Akkumulation die interneuronalen Projektionsbahnen zur Amygdala defekt sind, woraus sich ein verändertes Angstverhalten erklären ließe.

Diese Hypothese wird auch durch die Ergebnisse der Synapsenquantifizierung unterstützt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei APP/PS1KI-Mäusen bereits mit 2 Monaten ein signifikanter Synapsenverlust im Cortex und im Hippocampus existiert.

Weiterhin untersucht wurden die Eigenschaften des Antikörpers 6E10, der in vielen Studien zum Nachweis von intrazellulärem A β benutzt worden ist. Dabei wurde festgestellt, dass das Bild eher einer Färbung von APP und nicht einer Färbung von A β entspricht, sodass man schlussfolgern kann, dass es mit diesem Antikörper nicht möglich ist, spezifisch intrazelluläres A β nachzuweisen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass das Angstverhalten in Alzheimer-Mausmodellen verändert ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht die Amygdala selbst das zuerst betroffene Gebiet ist, sondern zunächst die wichtigsten Projektionsgebiete durch eine Akkumulation von intrazellulärem A β in ihrer neuronalen Funktion gestört sind, was dann zu einer veränderten Reaktion auf Angstreize führt.

Durch die beobachtete Korrelation von intrazellulärem A β in den Neuronen der Projektionsgebiete der Amygdala und verändertem Angstverhalten lässt sich auch in dieser Arbeit die modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese unterstützen, die die intrazelluläre A β -Akkumulation als zentralen Faktor der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit ansieht.

Literaturverzeichnis

- Aho L, Pikkarainen M, Hiltunen M, Leinonen V, Alafuzoff I (2010): Immunohistochemical visualization of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta in extra- and intracellular compartments in the human brain. *J Alzheimers Dis* 20, 1015-1028.
- Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* 64, 146-148.
- Areosa SA, Sherriff F, McShane R (2005): Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 20, CD003154.
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW (1991): The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1, 103-116.
- Ballard C, Neill D, O'Brien J, McKeith IG, Ince P, Perry R (2000): Anxiety, depression and psychosis in vascular dementia: prevalence and associations. *J Affect Disord* 59, 97-106.
- Bayer TA, Wirths O (2008): *Nervenarzt* 79, 117-128.
- Birks J (2006): Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 25, CD005593.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O et al. (2003): Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 184, 247-263.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006): Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387-403.
- Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *82*, 239-259.

- Brodaty H, Ames D, Snowdon J, Woodward M, Kirwan J, Clarnette R, Lee E, Lyons B, Grossman F (2003): A randomized placebo-controlled trial of risperidone for the treatment of aggression, agitation, and psychosis of dementia. *J Clin Psychiatry* 64, 134-143.
- Bungener C, Jouvent R, Derouesné C (1996): Affective disturbances in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc* 44, 1066-1071.
- Campion D, Brice A, Dumanchin C, Puel M, Baulac M, De La Sayette V, Hannequin D, Duyckaerts C, Michon A, Martin C et al. (1996): A novel presenilin 1 mutation resulting in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years. *Neuroreport* 7, 1582-1584.
- Caroni P (1997): Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71, 3-9.
- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirhth O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T et al. (2004): Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165, 1289-1300.
- Chang WP, Koelsch G, Wong S, Downs D, Da H, Weerasena V, Gordon B, Devasamudram T, Bilcer G, Ghosh AK et al. (2004): In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J Neurochem* 89, 1409-1416.
- Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel MC, Wirhth O, Bayer TA (2008): Transient intraneuronal A beta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol* 116, 647-655.
- Christensen DZ, Schneider-Axmann T, Lucassen PJ, Bayer TA, Wirhth O (2010): Accumulation of intraneuronal Abeta correlates with ApoE4 genotype. *Acta Neuropathol* 119, 555-566.

- Cotel MC, Bayer TA, Wirths O (2008): Age-dependent loss of dentate gyrus granule cells in APP/PS1KI mice. *Brain Res* 1222, 207-213.
- Cotel MC, Jawhar S, Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O (2010): Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiol Aging* , im Druck.
- Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J (1994): The Neuropsychiatric Inventory: comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology* 44, 2308-2314.
- Davies L, Wolska B, Hilbich C, Multhaup G, Martins R, Simms G, Beyreuther K, Masters CL (1988): A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques. *Neurology* 38, 1688-93.
- Dickson DW (1997): The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 321-339.
- DSM-IVTR 2007:
<http://www.behavenet.com/capsules/disorders/dsm4TRclassification.htm>
(05.11.2010).
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990): Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124.
- España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA (2009): Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry* 67, 513-521.
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997): Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and

- Alzheimer disease. A meta-analysis. *JAMA* 278, 1349-1356.
- Fernández-Vizarra P, Fernández AP, Castro-Blanco S, Serrano J, Bentura ML, Martínez-Murillo R, Martínez A, Rodrigo J (2004): Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol* 19, 823-844.
- Ferretti L, McCurry SM, Logsdon R, Gibbons L, Teri L (2001): Anxiety and Alzheimer's disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 14, 52-58.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y et al. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112-17.
- 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, 189-98.
- Förstl H: *Demenzen in Theorie und Praxis*, 1. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2000
- Gandy S (2005): The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115, 1121-1129.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L et al. (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 4913-4917.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ (1991): Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* 11, 3783-3793.

- Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383-388.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-356.
- Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN (2003): The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 1206-1209.
- Hoe J, Hancock G, Livingston G, Orrell M (2006): Quality of life of people with dementia in residential care homes. *Br J Psychiatry* 188, 460-464.
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D et al. (1997): Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 2892-2897.
- Hung AY, Selkoe DJ (1994): Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J* 13, 534-542.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR (1990): Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology* 40, 1721-1730.
- ICD-10 2009:
<http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2009/block-f00-f09.htm> (05.11.2010)
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994): Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45-53.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation:

implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693-4397.

Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2010): Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Aβ aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, im Druck.

Jellinger KA (2004): Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol* 17, 719-723.

Kimura R, Ohno M (2009): Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis* 33, 229-235.

Klüver H, Bucy PC (1937): "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 119, 352-353.

Knafo S, Venero C, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Gonzalez-Soriano J, Ferrer I, Santpere G, DeFelipe J (2009): Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pathol* 219, 41-51.

Krämer G, Förstl H: Alzheimer und andere Demenzformen, 5., überarbeitete Auflage; TRIAS Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, 2008

Kwok JB, Taddei K, Hallupp M, Fisher C, Brooks WS, Broe GA, Hardy J, Fulham MJ, Nicholson GA, Stell R et al. (1997): Two novel (M233T and R278T) presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport* 8, 1537-1542.

LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschield CC, Jay G (1995): The Alzheimer's Aβ peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9, 21-30.

- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K et al. (1995): Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973-977.
- Maren S (2001): Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24, 897-931.
- Masterman D (2003): Treatment of the neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *J Am Med Dir Assoc* 4, 146-154.
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985): Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 11, 2757-2763.
- Mayeux R (2003): Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 81-104.
- McDonald AJ (1998): Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55, 257-332.
- Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F (1996): Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J* 15, 1265-1274.
- Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA (2002): Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 9, 88-102.
- Morrison JH, Hof PR (1997): Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278, 412-419.
- Mortimer JA, Snowdon DA, Markesbery WR (2003): Head circumference, education and risk of demetia: findings from the Nun Study. *J Clin Exp Neuropsychol* 25, 671-679.

- Nukina N, Ihara Y (1986): One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *J Biochem* 99, 1541-1544.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L et al. (2006): Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129-10140.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421.
- Oddo S, Caccamo A, Tran L, Lambert MP, Glabe CG, Klein WL, LaFerla FM (2006): Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology. *J Biol Chem* 281, 1599-1604.
- Ohno M (2009): Failures to reconsolidate memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 92, 455-459.
- Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R (2007): BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 26, 134-145.
- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S et al. (2003): Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46-54.
- Permanne B, Adessi C, Saborio GP, Fraga S, Frossard MJ, Van Dorpe J, Dewachter I, Banks WA, Van Leuven F, Soto C (2002): Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J* 16, 860-862.

- Peters JM, Hummel T, Kratzsch T, Lötsch J, Skarke C, Frölich L (2003):
Olfactory function in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease:
an investigation using psychophysical and electrophysiological
techniques. *Am J Psychiatry* 160, 1995-2002.
- Pitkänen A: Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The Amygdala: A
Functional Analysis*, edited by Aggleton JP. Oxford Univ. Press, Oxford
2000, S. 31-115.
- Poirier J (1994): Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in
Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 17, 525-530.
- Pschyrembel W: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 262. neu bearbeitete
Auflage; Walter de Gruyter, Berlin 2010, S. 99, s.v. „Angst“
- Reisberg B, Auer SR, Monteiro IM (1996): Behavioral pathology in Alzheimer's
disease (BEHAVE-AD) rating scale. *Int Psychogeriatr* 8, 301-308.
- Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003): The amygdaloid
complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83, 803-834.
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance
MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ
et al. (1993): Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-
onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1467-72.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J,
Johnson-Wood K, Khan K et al. (1999): Immunization with amyloid-beta
attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse.
Nature 400, 173-177.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schäfer S, Wirths O, Tremp G, Czech C,
Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P et al. (2004): Hippocampal neuron
loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of
Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 164, 1495-1502.
- Seignourel PJ, Kunik ME, Snow L, Wilson N, Stanley M (2008): Anxiety in

dementia: a critical review. *Clin Psychol Rev.* 28, 1071-1082.

Selkoe DJ (2001): Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741-766.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K et al. (1995): Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754-760.

Sisodia SS, Kim SH, Thinakaran G (1999): Function and dysfunction of the presenilins. *Am J Hum Genet* 65, 7-12.

Street JS, Clark WS, Gannon KS, Cummings JL, Bymaster FP, Tamura RN, Mitan SJ, Kadam DL, Sanger TM, Feldman PD et al. (2000): Olanzapine treatment of psychotic and behavioral symptoms in patients with Alzheimer disease in nursing care facilities: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. The HGEU Study Group. *Arch Gen Psychiatry* 57, 968-976.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993): Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1977-1981.

Tagliavini F, Giaccone G, Frangione B, Bugiani O (1988): Preamyloid deposits in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease and nondemented individuals. *Neurosci Lett* 93, 191-196.

Terry AV Jr, Buccafusco JJ (2003): The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 821-827.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R et al. (1999): Beta-secretase cleavage of

Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741.

Wallesch CW, Förstl H: *Demenzen*, 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Imaki H, Wegiel J, Mehta PD, Silverman WP, Reisberg B (2007): Intraneuronal Abeta immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol* 113, 389-402.

Weiskrantz L (1956): Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 49, 129-158.

Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, Golde TE, Younkin SG, Trojanowski JQ, Lee VM (1993): Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9513-9517.

Wilcock GK (2003): Memantine for the treatment of dementia. *Lancet Neurol* 2, 503-505.

Wirhth O, Multhaup G, Czech C, Feldmann N, Blanchard V, Tremp G, Beyreuther K, Pradier L, Bayer TA (2002): Intraneuronal APP/A beta trafficking and plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenic mice. *Brain Pathol* 12, 275-286.

Wirhth O, Multhaup G, Bayer TA (2004): A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 3, 513-520.

Wirhth O, Weis J, Kaye R, Saido TC, Bayer TA (2007): Age-dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiol Aging* 28, 1689-1699.

Wirhth O, Breyhan H, Schäfer S, Roth C, Bayer TA (2008): Deficits in working

memory and motor performance in the APP/PS1ki mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29, 891-901.

Yuk DY, Lee YK, Nam SY, Yun YW, Hwang DY, Choi DY, Oh KW, Hong JT (2009): Reduced anxiety in the mice expressing mutant (N141I) presenilin 2. *J Neurosci Res* 87, 522-531.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: APP-Metabolismus	11
Abb. 1.2: Amyloid-Kaskaden-Hypothese	12
Abb. 1.3: Modifizierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese	13
Abb. 2.1: Bildbearbeitung für den Plaque-Load	27
Abb. 3.1: Elevated Plus Maze Test	31
Abb. 3.2: Open Field Test	32
Abb. 3.3: APP-Expression in APP/PS1KI-Mäusen	33
Abb. 3.4: A β -Ablagerungen in APP/PS1KI-Mäusen	34
Abb. 3.5: Axonale Degeneration in APP/PS1KI-Mäusen	35
Abb. 3.6: APP-Expression in 5xFAD	36
Abb. 3.7: A β -Ablagerungen in 5xFAD	37
Abb. 3.8: Axonale Degeneration in 5xFAD	38
Abb. 3.9: APP-Expression in 3xTg	39
Abb. 3.10: A β -Akkumulation in 3xTg	40
Abb. 3.11: AT8-Färbung in 3xTg	41
Abb. 3.12: 6E10-Färbung in 3xTg	42
Abb. 3.13: 6E10 vs 23850 in APP/PS1KI 6m	43
Abb. 3.14: Doppelfluoreszenzfärbung APP/PS1KI 6m	44
Abb. 3.15: Quantitative A β -Menge APP/PS1KI in verschiedenen Hirnregionen	45
Abb. 3.16: Quantitative A β -Menge 5xFAD in verschiedenen Hirnregionen	46
Abb. 3.17: Relative Synapsenmenge in APP/PS1KI vs. Wildtyp	46

7 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Primär-Antikörper	26
Tab. 2.2: Details der polyklonalen Sekundär-Antikörper	26

8 Anhang

8.1 Mini-Mental-Status-Test

Mini-Mental Status-Test (MMST)

Der MMST erlaubt anhand eines einfachen Fragebogens eine Abschätzung der kognitiven Fähigkeiten eines älteren Menschen. Erfasst werden z.B. Orientierung, Gedächtnis, Aufmerksamkeit und Rechnen, Sprache und konstruktive Praxis.

1. Testdauer

ca 10 Minuten

2. Auswertung

Einfache Addition der vorgegebenen Punkte

3. Interpretation

30-27 Punkte
keine Demenz

26-18 Punkte
leichte Demenz

17-10 Punkte
mittelschwere Demenz

≤ 9 Punkte
schwere Demenz

Mini-Mental Status-Test (MMST)

Name und Vorname des Patienten

Datum

1. Orientierung

- In welchem Jahr leben wir?
- Welche Jahreszeit ist jetzt?
- Welches Datum haben wir heute?
- Welchen Monat haben wir?
- In welchem Bundesland sind wir hier?
- In welchem Land?
- In welcher Ortschaft?
- Wo sind wir (in welcher Praxis / Altenheim)?
- Auf welchem Stockwerk?

2. Merkfähigkeit

Fragen Sie den Patienten, ob Sie sein Gedächtnis prüfen dürfen. Nennen Sie dann drei verschiedenartige Dinge klar und langsam (ca 1 pro sec) "Zitrone, Schlüssel, Ball". Nachdem Sie alle drei Worte ausgesprochen haben, soll der Patient sie wiederholen. Die erste Wiederholung bestimmt die Wertung (vergeben Sie für jedes wiederholte Wort einen Punkt), doch wiederholen Sie den Versuch, bis der Patient alle drei Wörter nachsprechen kann. Maximal gibt es 5 Versuche. Wenn ein Patient nicht alle drei Wörter lernt, kann das Erinnern nicht sinnvoll geprüft werden.

Punkte 0-3

3. Aufmerksamkeit und Rechnen

Bitten Sie den Patienten, bei 100 beginnend in 7er Schritten rückwärts zu zählen. Halten Sie nach 5 Subtraktionen (93, 86, 79, 72, 65) an und zählen Sie die in der richtigen Reihenfolge gegebenen Antworten. Bitten Sie daraufhin das Wort "Preis" rückwärts zu buchstabieren. Die Wertung entspricht der Anzahl von Buchstaben in der richtigen Reihenfolge (z.B. SIERP=5, SIREP=3). Die höhere der beiden Wertungen wird gezählt.

Punkte 0-5

4. Erinnern

Fragen Sie den Patienten, ob er die Wörter noch weiß, die er vorhin auswendig lernen sollte. Geben Sie einen Punkt für jedes richtige Wort.

Punkte 0-3

5. Benennen

Zeigen Sie dem Patienten eine Armbanduhr und fragen Sie ihn was das ist. Wiederholen Sie die Aufgabe mit einem Bleistift. Geben Sie einen Punkt für jeden erfüllten Aufgabenteil.

Punkte 0-3

6. Wiederholen

Bitten Sie den Patienten, den Ausdruck "Kein Wenn und Aber" nachzusprechen. Nur ein Versuch ist erlaubt.

Punkte 0-1

7. Dreiteiliger Befehl

Lassen Sie den Patienten den folgenden Befehl ausführen. "Nehmen Sie ein Blatt in die Hand, falten Sie es in der Mitte und legen Sie es auf den Boden." Geben Sie einen richtigen Punkt für jeden richtig ausgeführten Befehl.

Punkte 0-3

8. Reagieren

Schreiben Sie auf ein weißes Blatt in grossen Buchstaben: "Schließen Sie die Augen". Der Patient soll den Text lesen und ausführen. Geben Sie einen Punkt, wenn der Patient die Augen schließt.

Punkte 0-1

9. Schreiben

Geben Sie dem Patienten ein weißes Blatt, auf dem er für Sie einen Satz schreiben soll. Diktieren Sie den Satz nicht, er soll spontan geschrieben werden. Der Satz muß ein Subjekt und ein Verb enthalten und einen Sinn ergeben. Konkrete Grammatik und Interpunktion werden nicht verlangt.

Punkte 0-1

10. Abzeichnen

Zeichnen Sie auf ein weißes Blatt zwei sich überschneidende Fünfecke und bitten Sie den Patienten, die Figur genau abzuzeichnen. Alle 10 Ecken müssen vorhanden sein und 2 müssen sich überschneiden, um als ein Punkt zu zählen. Zittern und Verdrehen der Figur sind nicht wesentlich.



Punkte 0-1

Summe der Punkte

8.2 Neuropsychologisches Inventar (Auszüge)

Neuropsychiatric Inventory (NPI)

NPI (Cummings 1994)

Bitte führen Sie über nicht-kognitive Symptome und Verhaltensänderungen ein Interview mit der Bezugsperson in Abwesenheit der Patientin / des Patienten

1. Wahnvorstellungen

Leitfrage: „Hat die Patientin / der Patient Überzeugungen, von denen Sie wissen, dass sie nicht der Wirklichkeit entsprechen? Beharrt sie / er z.B. darauf, dass andere Leute versuchen, ihr / ihm Schaden zuzufügen oder sie / ihn zu bestehlen? Meint sie / er, dass Familienmitglieder nicht diejenigen sind, für die sie sich ausgeben, oder dass das Haus nicht ihr / sein Zuhause sei? Ich frage nicht nach einem bloßem Verdacht; ich möchte wissen, ob die Patientin / der Patient überzeugt ist, dass ihr / ihm diese Dinge passieren.“

- trifft nicht zu** Falls „nicht zutreffend“, kreuzen Sie das Kästchen links an, markieren Sie das entsprechende Kästchen im Bewertungsbogen (Seite A46) und gehen Sie weiter zu der Frage auf der übernächsten Seite.
- nein** Falls „nein“, kreuzen Sie das Kästchen links an, markieren Sie das entsprechende Kästchen im Bewertungsbogen (Seite A46) und gehen Sie weiter zu der Frage auf der übernächsten Seite.
- ja** Falls „ja“, kreuzen Sie das Kästchen links an und gehen Sie bitte weiter zu den folgenden Unterfragen.

Unterfragen

- | | nein | ja |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. Glaubt die Patientin / der Patient, dass sie / er in Gefahr ist, dass andere planen, ihr / ihm weh zu tun? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Glaubt die Patientin / der Patient, dass sie / er von anderen bestohlen wird? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Glaubt die Patientin / der Patient, dass ihr / sein Ehepartner sie / ihn betrügt? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. Glaubt die Patientin / der Patient, dass unwillkommene Gäste in ihrem / seinem Haus sind? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Glaubt die Patientin / der Patient, dass ihr / sein Partner /in oder andere Personen nicht diejenigen sind, die sie zu sein vorgeben? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Glaubt die Patientin / der Patient, dass das Haus, in dem sie /er lebt, nicht ihr /sein Zuhause ist? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. Glaubt die Patientin / der Patient, dass Familienmitglieder planen, ihn /sie zu verlassen? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Glaubt die Patientin / der Patient, dass Personen aus dem Fernsehen oder aus Zeitschriften tatsächlich bei ihr / ihm zuhause anwesend sind? (Versucht sie /er mit ihnen zu reden oder anderweitig mit ihnen Kontakt aufzunehmen?) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Glaubt sie /er irgendwelche ungewöhnliche Dinge, nach denen ich nicht gefragt habe? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

NPI (Fortsetzung)

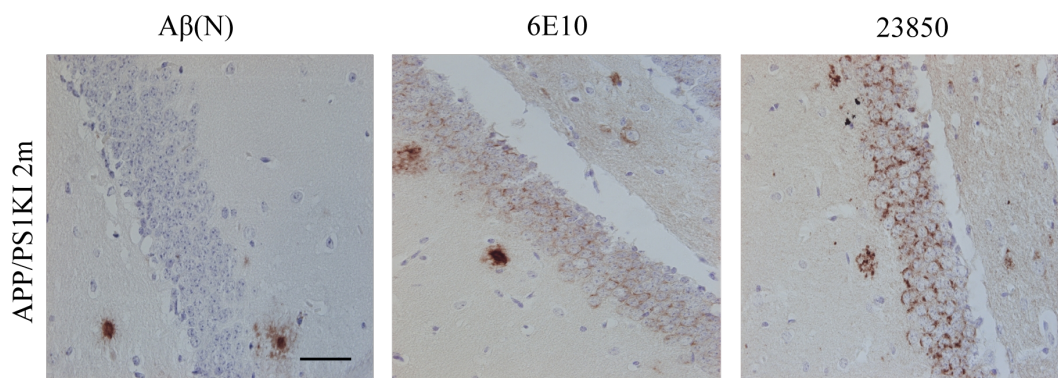
5. Angst

Leitfrage: „Ist die Patientin / der Patient ohne ersichtlichen Grund sehr nervös, beunruhigt oder verängstigt? Scheint sie / er sehr angespannt oder unruhig? Befürchtet die Patientin / der Patient von Ihnen getrennt zu werden?“

- trifft nicht zu** Falls „nicht zutreffend“, kreuzen Sie das Kästchen links an, markieren Sie das entsprechende Kästchen im Bewertungsbogen (Seite A46) und gehen Sie weiter zu der Frage auf der übernächsten Seite.
- nein** Falls „nein“, kreuzen Sie das Kästchen links an, markieren Sie das entsprechende Kästchen im Bewertungsbogen (Seite A46) und gehen Sie weiter zu der Frage auf der übernächsten Seite.
- ja** Falls „ja“, kreuzen Sie das Kästchen links an und gehen Sie bitte weiter zu den folgenden Unterfragen.

Unterfragen	nein	ja
1. Sagt die Patientin / der Patient, dass sie / er Angst hat vor geplanten Ereignissen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Gibt es Zeiten, in denen die Patientin / der Patient sich unsicher fühlt, sich nicht entspannen kann oder eine außerordentlich starke Spannung empfindet?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Gibt es Zeiten, in denen die Patientin / der Patient kurzatmig ist, nach Luft schnappt oder seufzt oder darüber klagt, ohne einen anderen ersichtlichen Grund als Nervosität?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Klagt die Patientin / der Patient über ein mulmiges Gefühl in der Magengegend oder über Herzrasen oder Herzklopfen in Verbindung mit Nervosität? (Die Symptome lassen sich nicht durch eine Erkrankung erklären)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Meldet die Patientin / der Patient bestimmte Orte oder Situationen, die sie / ihn nervöser machen wie Autofahren, Treffen mit Freunden oder den Aufenthalt in Menschenmengen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Wird die Patientin / der Patient nervös und aufgeregt, wenn sie / er von Ihnen getrennt wird (oder von ihrer / seiner Betreuungsperson)? (Klammert sie / er sich an Sie, um eine Trennung zu verhindern?)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Zeigt die Patientin / der Patient irgendwelche anderen Anzeichen von Angst?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

8.3 Gyrus dentatus, gefärbt mit A β (N), 6E10, 23850



Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas A. Bayer für die freundliche Bereitstellung des interessanten Themas, kontinuierliche Beratung und sein großes Interesse am Gelingen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich besonders Dr. Oliver Wirths danken, der während der gesamten Zeit für eine sehr gute und intensive Betreuung gesorgt hat und mit fachlicher Kompetenz bei Problemen immer helfen konnte.

Bei Petra Tucholla bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft und für ihre sehr herzliche Art, mit Studenten umzugehen.

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Sadeem Jawhar bedanken, die mich sehr gründlich in die Arbeitsmethoden eingeführt hat. Sie stand bei Fragen in jeglicher Hinsicht immer gerne hilfsbereit zur Seite.

Auch bei Antje Hillmann und Jessica Wittnam möchte ich mich bedanken, auch ihre Ohren waren für meine Fragen stets offen. Außerdem haben wir im Labor wirklich nette, lustige Stunden zusammen verbracht.

Curriculum Vitae

von Annika Nora Dins

Am 03.12.1985 wurde ich in Braunschweig geboren. Meine Eltern sind Gerda Dins (21.01.1950) und Dieter Ilmer (11.03.1947). Meine Geschwister sind Sonja Dins (15.10.1975) und Constantin Dins (01.11.1991).

In den Jahren 1992-1995 besuchte ich die katholische Grundschule Hohestieg in Braunschweig. Anschließend folgte von 1995-1998 die Schulausbildung an der Orientierungsstufe Hohestieg in Braunschweig.

Das Gymnasium Hoffmann-von-Fallersleben-Schule in Braunschweig besuchte ich von 1998-2005, an dem ich im Juni 2005 mit dem Abitur mit der Note 1,6 abschloss.

Seit dem Wintersemester 2005/2006 studiere ich an der Georg-August-Universität Göttingen Humanmedizin. Im August 2007 absolvierte ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 1,5.

Voraussichtlich werde ich das Studium im April 2012 beenden.