

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
(Prof. Dr. J. Wiltfang)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Passive Immunisierung mit einem N-trunkierten Abeta-
spezifischen Antikörper - Therapeutisches Potential von
NT4X in einem familiären Alzheimer-Mausmodell**

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

vorgelegt von
Maximilian Ueberück
aus
Osnabrück

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. T. A. Bayer

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. H. Jarry

Prüfungskommission

Referent/in

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Passive Immunisierung mit einem N-trunkierten Aβ-spezifischen Antikörper - Therapeutisches Potential von NT4X in einem familiären Alzheimer-Mausmodell" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 31.7.2018

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Risikofaktoren.....	2
1.3 Klinik	3
1.3.1 Symptomatik und Verlauf.....	3
1.3.2 Diagnostik.....	4
1.3.3 Therapie	5
1.4 Histopathologische Kennzeichen.....	6
1.4.1 Amyloid-Plaques	6
1.4.2 Neurofibrilläre Bündel.....	7
1.4.3 Neuroinflammation.....	7
1.4.4 Kortikale Atrophie und Neurodegeneration	8
1.5 A β -Entstehung und Bedeutung für die Alzheimer-Pathogenese	8
1.5.1 Das Amyloid-Vorläufer-Protein und seine Funktionen.....	9
1.5.2 Nicht-amyloidogener Weg.....	9
1.5.3 Amyloidogener Weg.....	9
1.5.4 Die Amyloid-Hypothese	10
1.5.5 Die physiologische Funktion von A β	11
1.5.6 A β -Varianten	12
1.5.6.1 A β pE3-x.....	13
1.5.6.2 A β 4-x	13
1.6 Genetik.....	14
1.7 Das 5XFAD-Mausmodell	15
1.8 Neue Therapieansätze	17
1.8.1 Aktive Immunisierung	17
1.8.2 Passive Immunisierung	18
1.8.2.1 Bapineuzumab	18
1.8.2.2 Solanezumab.....	18
1.8.2.3 Crenezumab	19
1.8.2.4 Aducanumab	19
1.8.2.5 NT4X	19
1.9 Ziele der Arbeit	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Kits und genutzte technische Apparaturen	23
2.1.2 Antikörper.....	23
2.1.3 Tiere	29
2.1.3.1 Haltungsbedingungen	30
2.1.3.2 Immunisierungsprotokoll.....	30
2.1.4 Gewinnung und Präparation der Mäusegehirne.....	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Nachweis des 5XFAD-Genotyps.....	32
2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsie	32
2.2.1.2 Nukleinsäure-Quantifizierung	33
2.2.1.3 Nukleinsäure-Amplifikation via Polymerase-Kettenreaktion	33

2.2.1.4 Gelelektrophorese	34
2.2.2 Darstellungen der Bindungsprofile der Antikörper	35
2.2.2.1 Vorbereitung der Peptide	35
2.2.2.2 Western Blots.....	36
2.2.3 Immunhistochemie.....	37
2.2.3.1 Paraffin-Einbettung der Mäusegehirne	37
2.2.3.2 Schneiden der Paraffinblöcke	38
2.2.3.3 3,3'-Diaminobenzidin-Immunhistochemie	38
2.2.3.4 Thioflavin-S-Färbung	40
2.2.4 Quantifizierung des Plaque Loads	41
2.2.4.1 Auswahl der Schnitte	41
2.2.4.2 Aufnahme der Fotos.....	41
2.2.4.3 Auswertung der Fotos	43
2.2.4.4 Fluoreszenzaufnahmen	44
2.2.5 Doublecortin – Quantifizierung	45
2.2.6 Subjektives +/- System bei humanen Schnitten.....	45
2.2.7 Statistik	46
2.2.8 Software	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Humanes Gewebe	48
3.1.1 Die Reisberg–Skala.....	49
3.1.2 Braak-Stadien.....	49
3.1.3 Die verwendeten Antikörper.....	49
3.1.3.1 NT4X	50
3.1.3.2 Solanezumab.....	50
3.1.4 Die subjektive +/- Methode	50
3.1.5 Objektive Plaque-Quantifizierung	52
3.2 Genotypisierung der 5XFAD-Mäuse.....	55
3.3 Western Blot	56
3.4 Inflammation in 5XFAD-Mäusen.....	58
3.5 Neurogenese in 5XFAD-Mäusen.....	61
3.6 Plaque Load der immunisierten Tiere.....	64
3.6.1 panA β -Färbung	64
3.6.2 A β pE3-x-Färbung	67
3.6.3 A β 4-x-Färbung.....	70
3.6.4 A β 1-x-Färbung.....	73
3.6.5 Thioflavin.....	76
4 Diskussion.....	80
4.1 NT4X bindet kaum an Plaques im humanen Gewebe	80
4.2 Die Inflammation nimmt im 5XFAD-Modell im Verlauf zu	81
4.3 Die Neurogenese fällt bei 5XFAD-Tieren nach sechs Monaten ab.....	82
4.4 NT4X kann den Plaque Load im präventiven Ansatz senken	84
4.5 Wirkungsmechanismus des NT4X-Antikörpers	89
4.6 Die Bedeutung der Blut-Hirn-Schranke	92
4.7 NT4X im Vergleich zu anderen Antikörpern	94
5 Zusammenfassung	96
6 Ausblick	98
7 Literaturverzeichnis	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Die Pathologien des 5XFAD-Mausmodells im Altersverlauf.....	16
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Mausgehirns im Sagittalschnitt	42
Abbildung 2.2: Foto des Kortex oberhalb des Hippocampus eines 5XFAD-Tieres	42
Abbildung 2.3: Kortexfotos in 20x-Vergrößerung	43
Abbildung 2.4 Kortexfoto für Plaque-Load-Quantifizierung	44
Abbildung 2.5: Thioflavin-und DAPI-Darstellung in einer 18 Wochen alten 5XFAD-Maus	45
Abbildung 3.1: NT4X im Vergleich zu Solanezumab (BS) im menschlichen Gewebe.....	51
Abbildung 3.2: Kreisdiagramme des +/- Systems der humanen Schnitte	52
Abbildung 3.3: Beispielfotos des humanen Gewebes für NTX und Solanezumab (BS)	53
Abbildung 3.4: Quantifizierung der erkannten Plaques NT4X vs. Solanezumab (BS) im humanen Gewebe.....	54
Abbildung 3.5: Gelelektrophoretischer Nachweis des Transgens bei 5XFAD-Mäusen	55
Abbildung 3.6: Western Blot des NT4X-Antikörpers	56
Abbildung 3.7: Western Blot des 1-57 Antikörpers	57
Abbildung 3.8: Vergleich der Neuroinflammation von drei und neun Monate alten 5XFAD-Tieren.....	59
Abbildung 3.9: Ergebnis der Neuroinflammation der unbehandelten 5XFAD-Mäuse	60
Abbildung 3.10: Ergebnisse der Neurogenese im Alterverlauf zwischen Wildtyptieren und 5XFAD-Mäusen.....	62
Abbildung 3.11: Beispielbilder der Neurogenese eines 12 Monate alten Wildtyptieres und einer 5XFAD-Maus	63
Abbildung 3.12: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in panA β -Färbung	65
Abbildung 3.13: Ergebnisse der panA β -Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse	66
Abbildung 3.14: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in A β pE3-x-Färbung .	68
Abbildung 3.15: Ergebnisse der A β pE3-x-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse	69
Abbildung 3.16: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in A β 4-x-Färbung.....	71
Abbildung 3.17: Ergebnisse der A β 4-x-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse.....	72
Abbildung 3.18: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in A β 1-x-Färbung.....	74
Abbildung 3.19: Ergebnisse der A β 1-x-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse.....	75
Abbildung 3.20: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse mit Thioflavin angefärbt	77
Abbildung 3.21: Ergebnisse der Thioflavin-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse..	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Verschiedene A β -Antikörper im Überblick.....	20
Tabelle 2.1: Chemikalien	24
Tabelle 2.2: Reagenzien und Lösungen	25
Tabelle 2.3: Kits.....	26
Tabelle 2.4: Maschinen.....	26
Tabelle 2.5: Hilfsmittel	27
Tabelle 2.6: Primäre Antikörper	27
Tabelle 2.7: Sekundäre Antikörper	29
Tabelle 2.8: Mastermix	33
Tabelle 2.9: PCR-Protokoll.....	34
Tabelle 2.10: TP-Protokoll	37
Tabelle 2.11: Software	47
Tabelle 3.1: Humanes Gewebe	48
Tabelle 3.2: +/- System.....	50

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid Beta
A β pE3-x	N-trunkiertes Amyloid Beta, beginnend mit Pyroglutamat an Position 3
A β 4-x	N-trunkiertes Amyloid Beta, beginnend mit Phenylalanin an Position 4
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
APH-1	<i>anterior pharynx-defective-1</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APLP	APP-like-Protein
BACE	<i>β-site APP cleaving enzyme</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BS	<i>biosimilar</i>
CT	Computertomographie
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DGPNN	Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
EEG	Elektroenzephalogramm
EOAD	<i>early-onset Alzheimer's disease</i>
FAD	<i>familial Alzheimer's disease</i>
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emmissionstomographie
ICD-10	International Classification of Diseases
LOAD	<i>late-onset Alzheimer's disease</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
LTD	<i>long-term depression</i>
MMST	Mini-Mental Status Test
MoCA	Montreal Cognitive Assessment
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NFT	Neurofibrilläre Bündel
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>

PEN	<i>presenilin enhancer-2</i>
PET	Positronen-Emmisionstomographie
PHF	gepaarte helikale Filamente
PSEN 1	Presenilin 1
PSEN 2	Presenilin 2
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Bei der Alzheimer-Krankheit handelt es sich um eine progrediente, neurodegenerative Erkrankung, bei der die Patienten vor allem unter zunehmender Gedächtnisschwäche, Problemen in der Alltagsbewältigung und Hilflosigkeit leiden. Sie stellt nicht nur ein persönliches und familiäres Problem, sondern außerdem durch ihre Häufigkeit auch ein gesellschaftliches und ökonomisches Problem dar.

Die Erkrankung wurde von Alois Alzheimer anhand seiner Patientin Auguste Deter erstbeschrieben (Alzheimer 1907). Interessanterweise wurde mehr als 100 Jahre später in dem Originalgewebe dieser Patientin eine familiäre Alzheimermutation im PSEN1-Gen nachgewiesen (Müller et al. 2013). Auch die in dieser Arbeit vorkommenden 5XFAD-Mäuse tragen unter anderem eine solche Mutation.

1.1 Epidemiologie

Alzheimer stellt mit einer Prävalenz von über 47 Millionen Patienten weltweit die häufigste Ursache für die Demenz dar (Alzheimer's Association 2010). Aufgrund der rasanten Inzidenz wird mit einer Zunahme der Häufigkeit gerechnet, sodass sich bis 2050 die Anzahl der Erkrankten etwa vervierfacht haben wird (Reitz et al. 2014). Alleine in den USA betragen die Kosten für die Behandlung und Pflege der Patienten etwa 172 Milliarden Dollar (Alzheimer's Association 2010).

Dabei erkranken mit etwa 95 % die meisten der Patienten an der senilen Form, Late-Onset Alzheimer's Disease (LOAD) (>65 Jahre), der Krankheit. Dem steht eine präsenile Form, Early Onset Alzheimer's Disease (EOAD), gegenüber. An dieser präsenilen (<65 Jahre) Form sind etwa 5% der Patienten erkrankt. Von dieser zweiten Gruppe tragen etwa 10-15% eine familiäre Belastung im Sinne einer autosomal dominanten Mutation (Campion et al. 1999)

Es stehen sich also eine sporadische, nicht familiär gehäufte Alzheimererkrankung und eine familiär gehäufte Alzheimer-Erkrankung gegenüber. Dabei ist die Prävalenz dieser familiären Alzheimer-Erkrankung (FAD) mit etwa 0,1% eher gering (Harvey et al. 2003).

1.2 Risikofaktoren

Die genaue Ätiopathogenese ist seit der Erstbeschreibung vor über 100 Jahren noch immer nicht vollends verstanden. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Verantwortlich sind also sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Faktoren (Mayeux und Stern 2012).

Die schwerwiegendste Komponente der Risikofaktoren ist ohne Zweifel das Altern. So verdoppeln sich die Inzidenzen ab dem 60. Lebensjahr alle fünf Jahre. Angefangen von einer Inzidenz von 0,08 %/Jahr bei Menschen, die 60 Jahre alt sind, schnell die Inzidenz bei Menschen, die 95 Jahre alt sind, auf 12,10%/Jahr hoch (Brookmeyer et al. 1998).

In Deutschland bedeutet das eine Prävalenz von 1,6 % in der Altersgruppe 65-69 und eine Prävalenz von 40,95% in der Altersgruppe von 95 und älter (Alzheimer Europe 2013).

Neben dem Alter wurden viele weitere Faktoren mit einem erhöhten Risiko, an Alzheimer zu erkranken, in Verbindung gebracht. So erhöhen zerebrovaskuläre Faktoren (Wen et al. 2007) Hypertonus und Hypercholesterinämie, (Kivipelto et al. 2001), Diabetes Typ 2 (Leibson et al. 1997), Über- und Untergewicht (Gustafson et al. 2009; Stewart et al. 2005), Rauchen (Doll et al. 2000), Schädel-Hirn-Traumata (Koponen et al. 2004) und ein niedriger sozioökonomischer Status und niedriger Bildungsstand (Hall et al. 2000) das Risiko zu erkranken.

Dem gegenüber stehen jedoch auch protektive Effekte. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass sowohl ein höherer Bildungsstand (Qiu et al. 2001) als auch soziale Teilhabe und intellektuelle Beschäftigung (Scarmeas et al. 2001) als auch mediterrane Diät (Scarmeas et al. 2006) und auch physische Aktivität (Wang et al. 2006) das Risiko zu erkranken, signifikant zu senken vermögen.

1.3 Klinik

1.3.1 Symptomatik und Verlauf

Alzheimer ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die sich vor allem durch Gedächtnisverlust, aber auch Stimmungsschwankungen, Persönlichkeitsveränderungen, Verwirrtheit und Schwierigkeiten beim Schlucken, Sprechen und Gehen auszeichnet (Alzheimer's Association 2010).

Dabei lässt sich die Erkrankung grob in drei Phasen einteilen (Jack et al. 2011), wobei es im klinischen Alltag wegen Überschneidungen schwierig sein kann, die Patienten zuzuordnen. Die erste Phase ist die präklinische, asymptotische Phase, in der bereits sowohl eine auffällige Histologie, als auch Bildmorphologie, sowie divergierende Biomarker festgestellt werden können (Sperling et al. 2011). Es ist anzumerken, dass A β -Ablagerungen und bildmorphologische zerebrale Atrophien in der Magnetresonanztomographie (MRT) dem klinischen Ausbruch der Erkrankung um Jahrzehnte vorangehen können (Villemagne et al. 2013).

Die zweite Phase ist eine symptomatische prädementielle Phase, die auch als Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung oder *mild cognitive impairment* (MCI) bezeichnet wird. In diesem Stadium leiden die Patienten bereits an Gedächtnisstörungen, erleben Probleme mit ihren exekutiven Funktionen, ihrer Aufmerksamkeit, ihrer Sprache und ihrer räumlich-visuellen Wahrnehmung und Orientierung. Es fällt ihnen schwer, neue Dinge zu behalten, und sie benötigen für komplexe Aufgaben, wie das Bezahlen von Rechnungen, deutlich länger, sind weniger effizient und machen mehr Fehler. Allerdings ist zu erwähnen, dass die Patienten in dieser Phase ihre Selbstständigkeit behalten. Sie können noch arbeiten und am sozialen Leben teilnehmen (Albert et al. 2011). Von den Patienten mit MCI entwickeln etwa 12 % pro Jahr die voll ausgeprägte Alzheimer-Erkrankung (Petersen 2004).

In dieser voll ausgeprägten Phase der Erkrankung, dem dritten Stadium, verlieren die Patienten ihre Eigenständigkeit durch eine zunehmende Verschlimmerung der exekutiven, vegetativen, funktionellen und motorischen Fähigkeiten. Im Laufe der Demenz werden sie bettlägerig, stumm und inkontinent, verlieren jede soziale Teilhabe, verlieren die Fähigkeit, bekannte Gesichter wiederzuerkennen, die Funktion zu sprechen und somit auch die eigenen Schmerzen zu kommunizieren (McKhann et al. 2011).

Besonders durch den Verlust motorischer Kontrolle und insbesondere des Schluckaktes kann sich die Lebenserwartung durch Aspirationspneumonie deutlich verkürzen (Wada et al. 2001).

Die mittlere Überlebenszeit beträgt nach Diagnose etwa 5-8 Jahre und ist geringer als die mittlere Überlebenszeit einer gleichaltrigen gesunden Population (Forstl und Kurz 1999; Tom et al. 2015).

1.3.2 Diagnostik

Die endgültige Diagnose des Morbus Alzheimer kann nur *post mortem* durch die Autopsie erfolgen. Für diese neuropathologische Absicherung der Diagnose kommt es auf Amyloid-Ablagerung und neurofibrilläre Bündel im Gehirn an (McKhann et al. 1984; Braak et al. 1991).

Allerdings gibt es laut der Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) und der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPNN) einige klinische Kriterien, die zum Beispiel in der ICD-10 hinterlegt sind, und einige apparative und laborchemische Untersuchungen, die den starken Verdacht auf die Erkrankung äußern lassen (Leitlinie Demenzen 2016).

Für die Diagnose „Demenz“ müssen nach ICD-10 Symptome, wie unter Absatz 1.3.1 beschrieben, für mindestens sechs Monate bestehen. Dabei müssen vorübergehende Verwirrheitszustände ausgeschlossen werden. Für die spezielle Zuordnung zu der Alzheimer-Demenz muss eine entsprechende Ausschlussdiagnostik, unter anderem die serologische und biochemische Untersuchung des Blutes, erfolgen (Leitlinie Demenzen 2016).

Neben der ausführlichen Eigen-, Fremd-, Familien- und Sozialanamnese mit Augenmerk auf die Medikamentenanamnese und die vegetative Anamnese stehen für den klinischen Alltag einige psychologische Kurztests zur Verfügung. Dazu zählen beispielsweise der Mini-Mental Status Test (MMST) oder das Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (Folstein et al. 1975; Nasreddine et al. 2005). In diesen Tests werden Aufmerksamkeit, exekutive Funktionen, Lang- und Kurzzeitgedächtnis sowie die räumliche, visuelle Orientierung geprüft.

Es wird außerdem die Untersuchungen des Liquor cerebrospinalis empfohlen (Leitlinie Demenzen, 2016). Dabei ist im Falle von vorliegendem Alzheimer eine Erhöhung des Gesamt Tau-Proteins und einer Verringerung des A β zu erwarten (Blennow und Zetterberg, 2009). Computertomographie (CT) und besonders das MRT können zu der Diagnostik dazugehören. Dabei kann eine Atrophie des gesamten Hirns und besonders der medialen Anteile des Temporallappens gesehen werden (Frisoni 2010). Allerdings ist die Spezifität zu gering, als dass darauf alleine die Diagnose gestellt werden könnte (Leitlinie Demenzen 2016).

Ebenso wird die Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissionstomographie (FDG-PET) nicht regelhaft empfohlen. Zur Abgrenzung zur Lewy-Körperchen-Demenz kann eine PET erfolgen und ein Amyloid-PET kann ebenfalls Hinweise auf die Ätiologie der Demenz liefern (Leitlinie Demenzen 2016).

Dem Elektroenzephalogramm (EEG) kommt ebenso nur ein geringer Stellenwert in der Diagnostik zu (Leitlinie Demenzen 2016).

1.3.3 Therapie

Die Alzheimer-Erkrankung ist nach wie vor nicht kausal therapierbar. Die Behandlungsoptionen, die in der S3 Leitlinie der DGN und DPGNN angegeben sind, beschränken sich auf eine Linderung der Symptome (Leitlinie Demenzen 2016). Zu der Therapie sollten sowohl nicht-medikamentöse als auch medikamentöse Ansätze gehören.

Es gibt Hinweise, dass Ergotherapie und körperliche Aktivität vor allem in der frühen Phase der Erkrankung einen positiven Effekt auf Alltagsfunktion und Kognition haben und die Progression verzögern (Hull und Voigt-Radloff 2008). Außerdem gibt es Hinweise, dass Patienten mit Demenz hinsichtlich Gedächtnis, Orientierung, Stimmung und Angst von der Musiktherapie profitieren (Gomez Gallego und Gomez Garcia 2017).

Für die medikamentöse Therapie stehen zwei Substanzklassen zur Verfügung. Zum einen werden Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil, Galanthamin oder Rivastigmin ab leichter Demenz gegeben. Diese Medikamente sorgen dafür, dass der Neurotransmitter Acetylcholin länger im synaptischen Spalt verweilen kann und somit länger wirken kann. Da besonders der mit Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebrachte *Nucleus basalis Meynert* diesen Neurotransmitter verwendet und im Zuge der Neurodegeneration atrophiert, stellt dies einen guten Ansatzpunkt der Intervention dar (Anand und Singh 2013).

Zum anderen werden Memantine verwendet. Dabei handelt es sich um nicht kompetitive N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Inhibitoren, die den Calciumeinstrom in die Zelle inhibieren und eine darauf folgende Glutamat-Ausschüttung verhindern. Glutamat wirkt exzitotoxisch in höherer Konzentration, sodass daher Memantinen ein neuroprotektiver Effekt nachgesagt wird. Memantine werden allerdings erst ab mittelschwerer bis schwerer Demenz empfohlen, da es für leichte Demenz keine belegten, positiven Effekte gibt (Winslow et al. 2011).

Für andere Substanzen wie Ginkgo, Vitamin E oder nichtsteroidale Antiphlogistika gibt es keine eindeutig bewiesenen Effekte, sodass keine klare Empfehlung ausgesprochen wird (Leitlinie Demenzen 2016).

1.4 Histopathologische Kennzeichen

Wie erwähnt, lässt sich die endgültige Diagnose der Alzheimer-Erkrankung nur durch die Autopsie stellen. Dabei erscheinen in den Gehirnen der Patienten einige charakteristische Kennzeichen der Erkrankung, wie extrazelluläre Amyloid-Plaques, intrazelluläre Konglomerate von Tau-Proteinen, Entzündungsreaktion und die kortikale Atrophie sowie Neurodegeneration.

Diese Kennzeichen sollen in den folgenden Absätzen vorgestellt werden.

1.4.1 Amyloid-Plaques

Extrazelluläre senile Amyloid-Plaques bestehen aus A β 1-42, aber auch aus verkürzten Varianten, wie beispielsweise A β pE3-x, A β 4-42 und A β 4-40 (s. Absatz 1.5.6). Diese Peptide neigen zur Aggregation, weswegen es über einen längeren Zeitraum zu einer Bildung von Plaques kommen kann. Dabei ist zu beachten, dass veränderte Konzentrationen von A β schon ein bis zwei Dekaden vor dem Ausbruch der Erkrankung detektiert werden können (Portelius et al. 2010; Gouras et al. 2015).

Die Ansicht der alleinigen krankheitsauslösenden Rolle der Amyloid-Plaques hat sich in den letzten Jahren geändert, sodass man nun annimmt, dass die Plaques weitgehend inert seien, allerdings möglicherweise als eine Art Reservoir für lösliche oligomere Formen von A β dienen (Morris et al. 2014). Dafür spricht, dass Amyloid-Plaques in nicht dementen Patienten im Rahmen des normalen Alterns auftauchen können und daher keine genaue Korrelation zwischen Plaques und Klinik erstellt werden kann (Price et al. 2009; Gouras et al. 2015).

1.4.2 Neurofibrilläre Bündel

Schon Alois Alzheimer war bei seiner Erstbeschreibung auf intrazelluläre filamentöse Einschließungen aufmerksam geworden (Alzheimer 1907). Beim Menschen bestehen diese Bündel aus Tau-Protein, welches 1975 erstmals isoliert werden konnte (Weingarten et al. 1975). Nachdem es in Neuronen an Tubulin gebunden hat, ist es für den Zusammenschluss und die Stabilisierung von Mikrotubuli wichtig (Serrano-Pozo et al. 2011).

Bei Alzheimer-Patienten liegt das Tau-Protein in einem hyperphosphorylierten Zustand vor, was dazu führt, dass Tau weniger an Tubulin bindet, dafür jedoch eine höhere Neigung besitzt, selbst zu gepaarten helikalen Filamenten (PHF) (Kidd 1963) zu aggregieren, die ihrerseits den Großteil der neurofibrillären Bündel (NFT) ausmachen (Iqbal et al. 2010).

Die genaue Bedeutung der NFT ist nicht endgültig geklärt. So existieren Stimmen, die besagen, dass sie einen protektiven Effekt haben und als Antwort der Patientin auf toxische Substrate zu interpretieren seien (Castellani et al. 2008).

Andererseits besteht, anders als bei den Amyloid-Plaques, bei den NFT eine bessere Korrelation zwischen histologischer Verteilung und Menge und der tatsächlichen klinischen Schwere der Erkrankung (Arriagada et al. 1992).

1.4.3 Neuroinflammation

Ein anderes Charakteristikum der Alzheimer-Erkrankung stellt die Neuroinflammation dar. Dabei sind es vor allem Mikroglia, Astrozyten, das Komplementsystem, aber auch Chemokine, wie Interleukin-1, Interleukin-6 oder auch der Tumor-Nekrose-Faktor und Cytokine, die an einer Entzündungsreaktion beteiligt sind (Nazem et al. 2015). Es ist zu beachten, dass Entzündungszellen sich in der Nähe der Amyloid-Plaques aufhalten, was dafür spricht, dass die Plaques als eine Art Reservoir dienen (Itagaki et al. 1989).

Unter normalen Umständen sollte die Entzündungsreaktion mit der Phagozytose des Amyloids abbrechen, aber es besteht die Theorie, dass durch die NFT und die übersteigerte Produktion von A β immer mehr proinflammatorische Substanzen gebildet werden und die Inflammation nicht abbricht, sondern immer weiter angetrieben wird und fortbestehen bleibt. Dieser Umstand macht antiinflammatorische Behandlungsstrategien, beispielsweise mit NSAR, interessant, allerdings sind die Studienergebnisse uneindeutig (Minter et al. 2016).

1.4.4 Kortikale Atrophie und Neurodegeneration

Die am leichtesten zu erkennende makroskopische Veränderung eines Gehirns eines Alzheimer-Patienten stellt die globale, zerebrale Atrophie dar, die besonders im limbischen System, dem Hippocampus, der Amygdala und dem entorhinalen Kortex ausgeprägt ist (Leung et al. 2013). Mit dem MRT kann nicht nur der Unterschied zwischen einem gesunden, alternden Patienten und einem Demenzkranken unterschieden werden, sondern mit einer Genauigkeit von etwa 80% auch die Progression von MCI zu voll ausgeprägtem Alzheimer bestimmt werden (Frankó und Joly 2013).

Das mikroskopische Pendant zu der Atrophie stellt die Neuronendegeneration dar. Dabei befällt der Neuronenverlust die gleichen Areale wie die NFT allerdings in verstärkter Form, sodass der Neuronenverlust eine bessere Korrelation zwischen Histologie und Klinik erlaubt (Gomez-Isla et al. 1996; Serrano-Pozo et al. 2011). Eine noch bessere Korrelation erlaubt die Ermittlung des Verlustes von Synapsen, der sich sogar noch vor dem Neuronenverlust ereignet und somit als sehr früher Marker in der Pathogenese angesehen werden kann (Scheff et al. 2007). Interessanterweise scheint es so, als würde die verbliebenen Synapsen eine erhöhte postsynaptische Breite aufweisen, was als Kompensationmechanismus interpretiert wird (Scheff und Price 1993; Serrano-Pozo et al. 2011).

1.5 A β -Entstehung und Bedeutung für die Alzheimer-Pathogenese

Da die A β -Plaques als eine der charakteristischen und auffälligsten histopathologischen Merkmale zu nennen sind und A β für die Pathogenese der Erkrankung eine Rolle zu spielen scheint, zielen einige therapeutische Interventionen, wie die in dieser Arbeit verwendete Antikörpertherapie, auf dieses Peptid ab (Ferreira und Klein 2011). Dieses Interesse kommt nicht zuletzt daher, weil es verschiedene Varianten dieses Peptids gibt, wobei besonders häufig das N-terminale Ende verkürzt ist (Masters et al. 1985).

1.5.1 Das Amyloid-Vorläufer-Protein und seine Funktionen

Bei dem Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) handelt es sich um ein integrales transmembran Protein Typ-1, welches sein Gen auf Chromosom 21 hat (Goate et al. 1991). Seine letztendliche Funktion ist nicht eindeutig geklärt, jedoch werden dem APP verschiedene positive Effekte zugeschrieben. Zu diesen Effekten gehören das Neuriten-Wachstum, die Synaptogenese, die Bewegungen von neuronalen Proteinen entlang von Axonen, transmembran Signalkaskaden, Zelladhäsion und Teilhabe im Calcium-Stoffwechsel (Zheng und Edward 2006).

Die Prozessierung des APP erfolgt über zwei verschiedene Wege, den nicht-amyloidogenen Weg und den amyloidogenen Weg, welche beide im Folgenden beschrieben werden.

1.5.2 Nicht-amyloidogener Weg

Das APP wird zunächst durch mehrere integrale Membranproteine gespalten, der α -Sekretase (Sisodia 1992), wobei es sich um Metalloendoproteinasen handelt (Roberts et al. 1994). Drei verschiedene Angehörige der ADAM Familie wurden zu der α -Sekretase dazugezählt, ADAM9, ADAM10 und ADAM17.

Diese drei Subtypen unterscheiden sich in ihrer Expression, wobei ADAM09 und ADAM17 für die regulierte Spaltung (Kuhn et al. 2010; Merlos-Suarez et al. 2001) und ADAM10 für die konstitutive Spaltung verantwortlich ist (Kuhn et al. 2010).

Es ist anzumerken, dass all diese Proteinasen innerhalb der A β -Domäne des APP schneiden, sodass kein A β entsteht und der α -Sekretase somit ein protektiver Effekt zugesprochen werden kann. Außerdem entstehen spezifische Spaltprodukte, wie das membranständige CTF83, welches von der γ -Sekretase in p3 und AICD geschnitten wird und das lösliche ektodomäne sAPP α (Zhang et al. 2011). sAPP α besitzt positive Effekte, wie den Schutz vor Exzitotoxizität oder die Proliferation von neuronalen Stammzellen (Furukawa et al. 1996; Zhang et al. 2011).

1.5.3 Amyloidogener Weg

Über diesen Weg entsteht das A β , welchem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung zugeschrieben wird. Hierfür wird das APP über die β -Sekretase in das membranständige CFT99 und das lösliche Ektodomäne sAPP β geschnitten. Zu der β -Sekretase wird BACE-1 (Sinha et al. 1999) und BACE-2 (Solans et al. 2000) gerechnet, wobei für die Entstehung des A β BACE-1 einen größeren Einfluss hat. Die γ -Sekretase schneidet nun CFT99 in AICD und A β , wobei sie sowohl A β 1-40 und A β 1-42 produzieren kann. Die γ -Sekretase ist ebenfalls ein integrales Membranprotein und besitzt Preselin-1 oder Presilin-2 als katalytische Untereinheit und außerdem Nicastrin, APH-1 und PEN-2 als Co-Faktoren. (Zhang et al. 2011).

Neben APP gibt es noch zahlreiche andere Substrate für die γ -Sekretase, wie Notch, Kadherine, Tyrosinase, ErbB4 und CD44 (Haass und Strooper 1999; Vetrivel et al. 2006).

1.5.4 Die Amyloid-Hypothese

Die Amyloid-Hypothese besagt, dass die Pathogenese des Morbus Alzheimer auf der gesteigerten Produktion oder dem verminderten Abbau von A β beruht. Demnach erfolge eine extrazelluläre Ablagerung von A β 1-40 und A β 1-42, die man als Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten erkennen kann, mit der kausalen Folge von Zerstörung der Synapsen, Neuronenverlust, Entzündung und Atrophie und schließlich dem klinischen Vollbild der Alzheimer-Demenz (Hardy und Allsop 1991).

Für diese Hypothese sprechen vor allem genetische Faktoren. So ist die Alzheimer-Erkrankung besonders häufig in frühen Lebensjahren bei Trisomie-21-Patienten zu finden. Es wurde gefolgert, dass sie, da sie drei Kopien des APP-Gens, welches auf Chromosom 21 lokalisiert ist, besitzen, eine erhöhte A β -Produktion haben (Zigman et al. 2008).

Zusätzlich wurden in EOAD Patienten verschiedene familiäre Mutationen ausfindig gemacht, die entweder in einem veränderten APP-Gen oder einem veränderten katalytischen Zentrum der γ -Sekretase, PSEN-1 oder PSEN-2, resultierten (Levy et al. 1990; Levy-Lahad et al. 1995; Sherrington et al. 1995). Diese Mutationen münden ebenfalls in einer erhöhten Produktion von A β , was für das erhöhte Risiko und das frühere Auftreten der Erkrankung bei diesen Patienten sorgt (Morris et al. 2014).

Zusätzlich wurde mit dem APOE4-Lipoprotein eine starke Verbindung zwischen genetischer Belastung und dem LOAD gefunden (Corder et al. 1993).

Verschiedene Argumente sprechen jedoch gegen die Amyloid-Hypothese. So ist es zumindest fragwürdig, mit familiären Mutationen zu argumentieren, wenn nur etwa 5% der Alzheimer Fälle auf solche zurückzuführen sind (Campion et al. 1999). Zusätzlich kann man bei bis zu 40 % von alten, nicht dementen Menschen histopathologische Zeichen der Erkrankung finden, ohne dass eine Erkrankung klinisch apparent ist (Price et al. 2009).

Die mögliche Lösung für dieses Problem stellen die löslichen A β -Oligomeren dar. Demnach bestehen erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von A β , die mit dem extrazellulären A β im Austausch stehen und wo die Plaques eine Art Reservoir darstellen. Diese Akkumulation von intraneuronalem A β führen schließlich zu der Toxizität (Ferreira und Klein 2011). In diesem Zusammenhang wird von der modifizierten Amyloid-Hypothese gesprochen (Wirhth et al. 2004).

1.5.5 Die physiologische Funktion von A β

Obwohl A β vor allem mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht wird, wird es in jedem Menschen physiologisch produziert (Cirrito et al. 2003). Ob A β nur ein überflüssiges Spaltprodukt oder selbst ein wichtiger Metabolit ist, wird diskutiert (Puzzo et al. 2008). Einige Arbeiten legen jedoch nahe, dass A β einen neurotrophen Effekt besitzt. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass bei heranreifenden, undifferenzierten Neuronen des Hippocampus geringe Mengen von A β neurotroph wirken, wohingegen höhere Konzentrationen von A β für reife Neurone neurotoxisch sind (Yankner et al. 1990). A β 1-42 hat möglicherweise einen positiven Effekt auf die Proliferation hippocampaler und subventrikulärer neuronalen Stammzellen (López-Toledano et al. 2004).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass nicht nur APP und seine anderen Metaboliten, sondern auch A β an der synaptischen Plastizität und Langzeit-Potenzierung und damit an der Gedächtnisfunktion beteiligt ist (Puzzo et al. 2008).

Das komplette Fehlen von APP, wie es bei APP-Knockout-Mäusen der Fall ist, ist mit dem Leben und der Fähigkeit zur Fortpflanzung vereinbar (Ring et al. 2007). Allerdings zeigen diese Mäuse einige Auffälligkeiten, wie eine geringere Größe des Körpers und des Gehirnes, verringerte Griffstärke, die Agenesie des Corpus Callosum, Defekte in der Homöostase im Kupfer- und Lipid-Stoffwechsel, eine erhöhte Anfälligkeit für Krampfanfälle und eine eingeschränkte Lernfähigkeit mit verringertem LTP (Ring et al. 2007). Dass APP- Knockout-Mäuse allerdings lebensfähig sind, könnte an dem Vorhandensein der APP-like Proteins

(APPLP) liegen. Diese Gruppe, bestehend aus APPLP1 und APPLP2, ist dem APP sowohl in Form als auch Funktion ähnlich (Anliker und Müller 2006). Produziert man double APP/APLP2 oder tripple APP/APLP1/APLP2 Knockout Mäuse, so sterben diese meistens früh postnatal (Koch et al. 1997; Herms et al. 2004). Im Falle der Tripple Knockout Mäuse lassen sich auffällige kraniale Anomalien, die der menschlichen Typ 2 Lissenzephalie entsprechen, finden, was die Wichtigkeit von APP und APLP besonders in der embryonalen Entwicklung unterstreicht (Herms et al. 2004).

1.5.6 A β -Varianten

A β -Varianten sind in der Regel zwischen 39 und 43 Aminosäurenlang, wobei A β 1-40 mit Asparaginsäure an Position 1 und Valin an Position 40 den größten Teil im Menschen ausmacht (Mori et al. 1992). Für die verschiedenen C-terminalen Längen sind verschiedene Prozessierungen in der γ -Sekretase verantwortlich. Dabei entstehen hauptsächlich A β 1-40 und das hydrophobere und somit zur Aggregation neigende A β 1-42 (Selkoe, 1996). Diese beiden Peptide stehen in einem festen Verhältnis von etwa 20:1 zueinander, wobei A β 1-40 deutlich überwiegt (Selkoe, 1996). Eine Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten von A β 1-42 kann womöglich schon früh den Übergang von MCI zu voll ausgeprägtem Alzheimer vorhersagen (Hansson et al. 2007).

Diese A β -Varianten sind jedoch nicht die am häufigsten vorkommenden in Gehirnen von Alzheimer-Patienten. So konnte gezeigt werden, dass sowohl in Patienten mit Alzheimer als auch in Patienten mit MCI über 60% der A β -Varianten N-terminal verkürzt sind (Sergeant et al. 2003).

Die verschiedenen N-terminal verkürzten Peptide entstehen einerseits durch verschiedene enzymatische Aktivitäten an unterschiedlichen Positionen des Peptids (Bayer und Wirths 2014) und andererseits durch verschiedene posttranslationale Modifikationen, wie der Bildung von Pyroglutamat (Schlenzig et al. 2012), Racemisierung (Tomiyama et al. 1994), Isomerisierung (Shimizu et al. 2000), Oxidation (Dong et al. 2003) oder Phosphorylierung (Kumar et al. 2011). Es ist zu beachten, dass N-trunkierte A β -Varianten physiologisch nicht vorkommen und somit krankheitsspezifisch sind (Schlenzig et al. 2012).

Auf die beiden häufigsten N-trunkierte A β -Varianten, A β pE3-x und A β 4-x, und ihre veränderten Eigenschaften soll im Folgenden eingegangen werden.

1.5.6.1 A β pE3-x

A β pE3-x beginnt mit Pyroglutamat und stellt mit 15-20% eine häufige Variante in den Gehirnen von Patienten dar (Mori et al. 1992). Ausgehend von Glutamat oder Glutamin ist es das Enzym Glutamylcyclase, welches für die Pyroglutamylierung verantwortlich ist (Morawski et al. 2014). Durch den Verlust der ersten beiden Aminosäuren und die Bildung eines Laktam-Ringes wird das Peptid hydrophober, weniger wasserlöslich und neigt somit stärker zur Aggregation (Saido et al. 1996). Es wurde außerdem berichtet, dass A β pE3-x sich zeitlich früher in der Pathogenese abgelagert als A β 1-40/42 (Saido et al. 1996). Es wird außerdem diskutiert, dass A β pE3-40 eine höhere Toxizität besitzt als das Volllängen-Peptid A β 1-40/42.

Im TBA2-Mausmodell, welches viel A β pE3-42 exprimiert zeigt sich die toxische Wirkung dieses Peptids. Die Mäuse zeigen vermindertes Wachstum, zerebrale Atrophie und neurologische Schwächen, wie schwindende motorische Koordination und Ataxie (Wirhth et al. 2009).

1.5.6.2 A β 4-x

Es konnte bereits 1985 gezeigt werden, dass eine N-trunkierte A β -Variante, die mit Phenylalanin an Position 4 beginnt, mit bis zu 64% den größten Teil der Amyloid-Plaques ausmacht, und dass A β 4-x noch häufiger als A β 1-42 und A β pE3-x in Kortex und Hippocampus von Alzheimer-Patienten vorkommt (Masters et al. 1985; Portelius et al. 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass A β 4-x nicht nur in Alzheimerfällen, sondern auch in Patienten mit vaskulärer Demenz auftritt (Lewis et al. 2006).

Nicht nur zeigt A β 4-x ähnlich wie A β pE3-x eine deutlich höhere Neigung zur Bildung von Aggregaten und Fibrillen als A β 1-42, sondern es hat auch eine *in vitro*-Toxizität auf Neurone (Bouter et al. 2013). Zusätzlich konnte auch die *in vivo*-Toxizität mittels des Tg4-42-Mausmodells, welches A β 4-x exprimiert, bewiesen werden, denn die Tiere zeigen histopathologisch einen Neuronenverlust und im Phänotyp ein reduziertes Lernverhalten (Bouter et al. 2013).

Im5XFAD-Mausmodell tritt A β 4-x sogar noch vor A β pE3-x auf und A β 4-42 konnte schon bei Trisomie 21 Kindern von 3-4 Jahre nachgewiesen werden (Antonios et al. 2013, Mori et al. 2002). Durch all diese Faktoren kann A β 4-x als ein gutes, therapeutisches Zielprotein angesehen werden (Bayer und Wirhth 2014).

1.6 Genetik

Obwohl nur etwa 5-10% der Alzheimerfälle als EOAD klassifiziert werden, kommt dieser Gruppe großes Interesse entgegen (Alzheimer's Disease International 2009). Dies entspringt der Tatsache, dass EOAD entgegen der multifaktoriellen Genese der LOAD, 92-100% genetisch determiniert ist (Wingo et al. 2012). Über die Vererbungsart der Mutationen herrschen Diskussionen, so wird von 10-15% autosomal dominanter Mutationen gesprochen (Campion et al. 1999) und von etwa 90% autosomal rezessiver Mutationen (Wingo et al. 2012). Patienten, die solche Mutationen tragen, erkranken dabei früher und ihre Krankheit nimmt einen schnelleren Verlauf.

Die entscheidenden Gene sind dabei jene, die für APP auf Chromosom 21, PSEN-1 auf Chromosom 14 und PSEN-2 auf Chromosom 1 codieren. Besonders dem APP-Gen kam dabei früh Aufmerksamkeit entgegen, da Patienten mit Trisomie-21 häufig und früh Morbus Alzheimer entwickeln (Cacace et al. 2016). Die erste entdeckte Mutation war dabei die sogenannte *London Mutation* (Goate et al. 1991).

Seitdem wurden 52 Mutationen im APP-Gen ausfindig gemacht, wobei die meisten in der Nähe der Schnittstellen der entsprechenden Enzyme liegen (Cacace et al. 2016). Dabei ist die Lokalisation der Mutation entscheidend für die Konsequenz. So sorgt eine Mutation in der Nähe der β -Sekretase dafür, dass insgesamt mehr A β gebildet wird, wohingegen eine Mutation in der Nähe der γ -Sekretase dafür sorgt, dass sich das Verhältnis von A β 1-42 zu A β 1-40 zugunsten von A β 1-42 verschiebt, welches eine höhere Aggregationsneigung besitzt (Tanzi und Bertram 2005; Selkoe 1996).

Wenn sich die Mutation jedoch innerhalb der A β -Region des APP-Gens befindet, so können die resultierenden A β -Varianten andere biochemische Eigenschaften, wie eine höhere Neigung zur Aggregation oder eine erhöhte Stabilität, aufweisen (Haass et al. 1994).

Interessanterweise können Mutationen im APP-Gen auch den entgegengesetzten Effekt haben und einen Benefit für die Kognitivität und die Erkrankungswahrscheinlichkeit haben. Dies geschieht, wenn die Mutation in der β -Sekretase liegt und dadurch letztendlich weniger A β entsteht. (Jonsson et al. 2012)

Wie in Absatz 1.5.3 beschrieben, sind PSEN-1 und PSEN-2 als katalytische Untereinheit der γ -Sekretase direkt an der Entstehung von A β beteiligt. Für das PSEN-1 Gen sind 215 Mutationen, für das PSEN-2 Gen 31 Mutationen bekannt (Cacace et al. 2016). Ähnlich wie APP sorgen auch Mutationen in diesen Genen für mehr A β oder ein verändertes Verhältnis von

A β 1-42 zu A β 1-40. Die schwerwiegenderen Effekte sind dabei in PSEN-1-Mutationen zu beobachten, denn hier erkrankten die Patienten mit 35-55 Jahren, bei APP zwischen 40-65 Jahren und bei PSEN-2 zwischen 40-70 (Ryan und Rossor, 2010). Interessanterweise konnte im Nachhinein bei Auguste Deter, der Patientin, an der Alois Alzheimer die Krankheit erstbeschrieb, eine Mutation im PSEN-1-Gen festgestellt werden (Müller et al. 2013).

Auch in der sporadischen Form des Morbus Alzheimer spielen genetische Faktoren eine Rolle, auch wenn keine gezielten Mutationen ausfindig gemacht werden können. So ergaben Zwillingsstudien eine Vererbbarkeit von bis zu 58% (Gatz et al. 2006). Besonders hervorzuheben sind dabei Polymorphismen, allen voran im ApoE-Gen.

Das ApoE-Gen ist im Fettstoffwechsel aktiv und wird im ZNS von den Astrozyten exprimiert, wobei es im Falle von Verletzungen und neurodegenerativen Defekten hochreguliert wird (Strittmatter et al. 1993). Es existieren drei ApoE-Allele: ApoE ϵ 2, ApoE ϵ 3 und ApoE ϵ 4, wobei ApoE ϵ 4 mit einem erhöhten Risiko für Alzheimer in Verbindung gebracht wird, während ApoE ϵ 2 einen protektiven Effekt zu haben scheint. (Cacace et al. 2016; Corder et al. 1994). Bei heterozygoten Trägern von ApoE ϵ 4 erhöht sich die Erkrankungswahrscheinlichkeit für Alzheimer um das Dreifache, bei Homozygoten sogar um das 15-Fache (Corder et al. 1993).

1.7 Das 5XFAD-Mausmodell

Es existieren zahlreiche Mausmodelle für den Morbus Alzheimer, wovon die meisten auf einer Überexpression von humanem APP basieren. Sie unterscheiden sich in der histopathologischen Ausprägung der Erkrankung und in den Einschränkungen in den verschiedenen Verhaltenstests (Webster et al. 2014). Hier soll das in dieser Arbeit verwendete 5XFAD-Modell genauer vorgestellt werden.

Bei den von Oakley et al. (2006) entwickelten 5XFAD-Mäusen handelt es sich um transgene Mäuse, die fünf Mutationen für familiären Alzheimer (FAD) tragen. Sie exprimieren dabei drei Mutationen im APP-Gen und zwei im PSEN-1-Gen. In die 5XFAD-Maus wurde dabei die 695 Aminosäuren lange Isoform des humanen APP-Gens gebracht, wobei dieses sowohl die Florida (I716V)- als auch die London (V717I)- als auch die Schwedische (K670N/M671L)-Mutation enthält.

Zusammen mit den beiden PSEN-1 (M146L; L286V)-Mutationen sorgen die Florida- und die London-Mutation für eine erhöhte A β x-42-Produktion, während die Schwedische Mutation das Gesamtlevel an A β erhöht (Oakley et al. 2006).

Um dabei eine bessere Vergleichbarkeit zu anderen Alzheimer-Mausmodellen zu bewahren wurden die 5XFAD-Mäuse, die ursprünglich aus dem C57/B6xSJL-Stamm gezüchtet wurden, auf den genetischen C57BL/B6-Hintergrund zurückgekreuzt (Jawhar et al. 2012).

5XFAD-Mäuse zeigen schon mit 1,5 Monaten erhöhte nachweisbare Mengen von intraneuronalem A β (Eimer und Vassar 2013). Nach zwei Monaten beginnt die Ablagerung von extrazellulären Plaques, die von Entzündungsreaktionen mit Astrogliose und Mikrogliose begleitet werden. Diese A β -Plaque-Pathologie nimmt im Altersverlauf rasant zu (Oakley et al. 2006). Bei etwa vier Monate alten Tieren beginnt die Degeneration der Synapsen. Zeitgleich beginnt der Neuronenverlust und erste Gedächtnisverluste sind im Y-Maze erkennbar (Oakley et al. 2006). Später kommen Veränderungen im Arbeitsgedächtnis und im episodischen Gedächtnis, die sich beispielsweise im Morris Water Maze zeigen, dazu. Außerdem zeigen sie eine verringerte Ängstlichkeit und eine veränderte Angst-Konditionierung (Oakley et al. 2006; Devi und Ohno 2010). Veränderung in der Langzeit-Potenzierung (LTP) und der Langzeit-Depression (LTD) sind ab etwa sechs Monaten nachweisbar (Kimura und Ohno 2009). Nach neun Monaten ist der Verlust von Neuronen und Synapsen stark ausgeprägt (Zhang et al. 2009). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Neurogenese der 5XFAD-Tiere im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant vermindert ist (Moon et al. 2014).

Phänotypisch präsentieren sich 5XFAD-Mäuse mit einem geringeren Körpergewicht als Wildtypiere und ihre motorischen Fähigkeiten nehmen altersabhängig ab (Jawhar et al. 2012)

Die Abbildung 1.1 zeigt den Alterverlauf mit den zugehörigen Pathologien im Überblick.

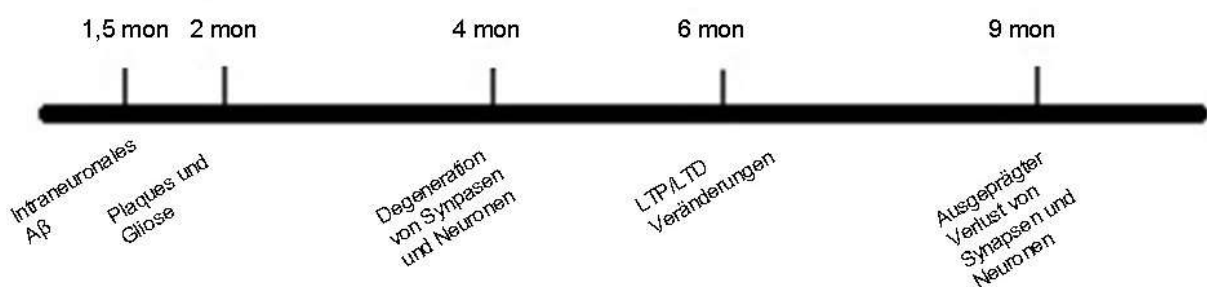


Abbildung 1.1: Die Pathologien des 5XFAD-Mausmodells im Altersverlauf

1.8 Neue Therapieansätze

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden, symptomorientierten Therapieoptionen, die in Absatz 1.3.3 besprochen wurden, wird umfassend nach neuen Möglichkeiten gesucht, die Krankheit zu behandeln. Dabei erscheint die Antikörpertherapie besonders aussichtsreich, wobei man zwischen aktiver und passiver Immunisierung unterscheiden muss.

1.8.1 Aktive Immunisierung

Aktive Immunisierung bedeutet, eine Reaktion des Immunsystems des Körpers hervorzurufen, sodass dieser selbst Antikörper gegen eine Noxe produziert. A β wird, selbst wenn es im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung pathologisch geworden ist, letztendlich auch physiologisch gebildet, sodass dieser Ansatzpunkt mit gewissen Sicherheitsbedenken verbunden ist (Town 2009).

Das Potential der aktiven Immunisierung wurde bereits früh demonstriert, indem PDAPP-Mäusen, die ebenfalls das humane APP exprimieren, gegen A β 1-42 geimpft wurden und damit bei jungen Tieren die Plaque-Pathologie, die Neuritdystrophien und die Astroglieose fast gänzlich verhindert werden konnten und auch bei älteren Tieren die Pathologien deutlich eingeschränkt werden konnten (Schenk et al. 1999).

Dieser Ansatz wurde schnell auf den Menschen übertragen und der Impfstoff AN-1792 erschaffen, welches mit synthetischem A β 1-42 arbeitete. Die Entwicklung wurde jedoch in Phase II abgebrochen, nachdem etwa 6% der Patienten eine aseptische Enzephalomeningitis nach Applikation entwickelten (Check, 2002). Das sorgte dafür, dass sich die Wissenschaft eher von der aktiven Immunisierung gegen A β abwandte, obwohl in der Obduktion der Patienten, die mit AN-1792 behandelt wurden, durchaus positive Effekte festgestellt werden konnten, was Plaque-Pathologie anging, und manche Patienten sogar klinisch von der Behandlung profitierten (Town 2009).

Nachdem die aktive Immunisierung gegen A β sich als nicht zielführend erwiesen hat, wird nun an der aktiven Immunisierung gegen das Tau-Protein geforscht. So konnte mithilfe eines

monoklonalen Antikörpers eine Domäne, die für die pathologische Interaktion innerhalb mehrerer Tau-Proteine untereinander verantwortlich ist, gefunden werden. Gegen diese Domäne wurde der Impfstoff AADvac1 hergestellt, der sich derzeit in Phase II der klinischen Erprobung befindet (Kontsekova et al. 2014).

1.8.2 Passive Immunisierung

Diese Sicherheitsbedenken, die gegenüber der aktiven Immunisierung herrschen, sind bei der passiven Immunisierung nicht gegeben, sodass großes Interesse an dieser Therapieform besteht. Einige Antikörper befanden oder befinden sich in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung, wie beispielsweise Crenezumab, Solanezumab, Bapineuzumab oder Aducanumab. Zusätzlich befinden sich vielversprechende Antikörper gegen N-trunkierte A β -Varianten wie der NT4X in der präklinischen Erprobung.

1.8.2.1 Bapineuzumab

Bapineuzumab ist ein humanisierter, monoklonaler IgG1-Antikörper, der sich gegen den N-Terminus des A β richtet, wobei er die A β 1-5-Region erkennt (Panza et al. 2011). Obwohl der Antikörper in einer Phase-II-Studie das im PET gemessene kortikale A β -Level senken konnte, ergab eine andere Phase-II-Studie, dass ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung eines vasogenen Hirnödems bestand (Salloway et al. 2009; Rinne et al. 2010). Außerdem konnten letztendlich in Phase-III-Studien keine signifikanten Verbesserungen der Patienten gezeigt werden, sodass die Studien mit Bapineuzumab abgebrochen wurden (Blennow et al. 2012).

1.8.2.2 Solanezumab

Bei Solanezumab handelt es sich um einen humanisierten, monoklonalen IgG1-Antikörper, der gegen die zentrale Region von A β 13-28 gerichtet ist und außerdem verschiedene N-trunkierte A β -Varianten, beispielsweise A β pE3-x, erkennt (Imbimbo et al. 2012; Rygiel,

2016). Dabei bindet Solanezumab eher an lösliche Oligomere und besonders Monomere, als fibrilläres A β (Tayeb et al. 2013; Bouter et al. 2015). Obgleich es in zwei Phase-III-Studien schien, als gäbe es Verbesserungen, was die kognitive Abnahme der Patienten mit leicht ausgeprägtem Alzheimer anbelangte, konnte eine weitere groß angelegte Phase-III-Studie des Pharmakonzerns Eli Lilly keine signifikanten Verbesserungen reproduzieren, sodass die Entwicklung eingestellt wurde (Honig et al. 2018).

1.8.2.3 Crenezumab

Bei Crenezumab handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen IgG4-Antikörper, der sich gegen die A β 12-23-Region richtet, wobei er im Gegensatz zu Solanezumab eher fibrilläres A β als lösliche Oligomere erkennt (Rygiel 2016). In ersten Phase-II-Studien konnte einer Verlangsamung der kognitiven Abnahme erzielt werden (Adolfsson et al. 2012). Mit Crenezumab werden derzeit mehrere Phase-III-Studien durchgeführt (Blaettler et al. 2016).

1.8.2.4 Aducanumab

Anders als Bapineuzumab, Solanezumab und Crenezumab, handelt es sich bei Aducanumab um einen humanen Antikörper, der gegen ein konformatives Epitop auf A β gerichtet und an Plaques und A β -Oligomere, nicht jedoch an A β -Monomere bindet (Selkoe und Hardy 2016). In einer Phase-Ib-Studie konnte er sowohl im PET die A β -Belastung senken, als auch den Progress der kognitiven Abnahme der Patienten, gemessen im MMST, deutlich aufhalten (Selkoe und Hardy 2016). Aducanumab befindet sich derzeit in Phase III der klinischen Testung.

1.8.2.5 NT4X

Es wurde bereits beschrieben, dass N-trunkierte A β -Varianten häufig und früh bei Alzheimer-Patienten auftreten und zusätzlich nicht physiologisch auftreten, sondern immer pathologisch sind. Aus diesen Gründen stellen Antikörper, die sich gegen N-trunkierte A β -Varianten richten ein möglicherweise gutes Ziel zur therapeutischen Intervention dar (Bayer und

Wirhth 2014). Ein solcher Antikörper, der sich spezifisch gegen A β pE3-x richtet ist 1-57. Ein anderer ist NT4X (Wirhth et al. 2010a).

Beim NT4X handelt es sich um einen murinen monoklonalen IgG2b-Antikörper, der sich vor allem gegen die N-trunkierten A β -Varianten A β pE3-x und A β 4-x richtet (Antonios et al. 2013). Dabei richtet er sich vor allem gegen Oligomere und besitzt nur eine geringe Affinität zu Plaque gebundenen A β -Fibrillen. Im ELISA Verfahren konnte diese Spezifität nachgewiesen werden, denn als Epitop von NT4X ließ sich N-trunkiertes A β 2-4 mit dem stärksten Signal für A β 4-x darstellen (Antonios et al. 2013).

Im Tg4-42-Mausmodell, welches selektiv A β 4-42 ausbildet, ließ sich mithilfe des NT4X die Gedächtnisschwäche der Tiere lindern und auch der Neuronenverlust wurde hier verlangsamt (Antonios et al. 2015). Zusätzlich konnte NT4X im 5XFAD-Modell die frühe intraneuronale Ansammlung von A β 4-x erkennen und zeigte dabei keine Kreuzreaktion zu zerebralen Proteinablagerung anderer neurodegenerativer Erkrankungen (Antonios et al. 2013).

In einem therapeutischen Versuch mit Start der Immunisierung bei dreimonatigen 5XFAD-Tieren konnte eine signifikante Senkung ($p^{**}<0.01$) des Plaque Loads mit A β pE3-x und schwach signifikante Senkung ($p^{*}<0,5$) in der Thioflavin-Färbung und der A β x-40-Färbung erzielt werden (Antonios et al. 2015).

Tabelle 1.1: Verschiedene A β -Antikörper im Überblick

1.9 Ziele der Arbeit

Antikörper	Immunglobulin	Bindungseigenschaften/ Binungsstelle	Firma	Klinische Phase
Bapineuzumab	humanisierter IgG1-Antikörper	Bindet eher an monomeres und fibrilläres N-terminales A β 1-5	Janssen, Pfizer	Phase III aufgrund fehlenden klinischen Benefits abgebrochen
Solanezumab	humanisierter IgG1-Antikörper	Bindet an lösliches monomeres und besonders oligomeres A β an der zentralen A β 13-28-Region	Eli Lilly & Co	Phase III aufgrund fehlenden klinischen Benefits abgebrochen
Crenezumab	humanisierter IgG4-Antikörper	Bindet eher fibrilläres als monomeres A β an der zentralen A β 12-23-Region	AC Immune SA, Genentech, Hoffmann-La Roche	Phase III laufend
Aducanumab	humaner IgG1-Antikörper	Bindet oligomeres und aggregiertes A β an einem konformativen Epitop auf A β	Biogen	Phase III laufend
NT4X	muriner IgG2b-Antikörper	Bindet vor allem lösliches, oligomeres A β , kaum Affinität zu fibrillärem A β . Bindet an A β pE3-x, A β 4-x, wenig A β 1-42	Vgl. Antonios et al. 2015	Präklinische Testung

Zunächst sollen als Nebenprojekt zur besseren Charakterisierung des 5XFAD-Mausmodells im longitudinalen Vergleich die Veränderungen bezüglich Inflammation und Neurogenese untersucht werden.

Ferner soll die Bindungsaffinität von NT4X zu Plaques im humanen Gewebe im Vergleich zu einem Kontrollantikörper untersucht werden.

Wie bereits erwähnt, stellen N-trunkierte A β -Varianten eine ausschließlich pathologische Erscheinung in Alzheimer-Gehirnen dar. Wie gezeigt werden konnten, erreicht der NT4X in einer Immunisierung, die bei fünf Monaten anfängt, im 5XFAD-Mausmodell nur eine gering signifikante Verbesserung (Antonios et al. 2015). Es soll daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, wie der NT4X in einem präventiven Ansatz in diesem Mausmodell wirkt. Wie in Absatz 1.7 beschrieben, beginnt bei sechs Wochen alten Tieren die intraneuronale Ablagerung von A β . Das ist der Zeitpunkt, ab dem die Tiere im Zuge dieser Arbeit ihre wöchentliche Immunisierung erhalten haben.

Es soll dann geschaut werden, wie sich nach 12 Wochen Immunisierung der Plaque Load für panA β , A β 1-x, A β pE3-x, A β 4-x und Thioflavin verändert.

Wenn die Versuche die bestehenden Daten des NT4X bestätigen, würde dies die Annahme, dass A β 4-x ein mögliches therapeutisches Target in der Therapie des Morbus Alzheimer ist, untermauern.

Es folgen die Ziele dieser Arbeit im Überblick:

- Charakterisierung des 5XFAD-Modells für Neurogenese und Inflammation
- Bindungsverhalten von NT4X im humanen Gewebe
- Validierung des Bindungsprofils von NT4X
- Auswirkung auf die Plaque-Belastung von passiver Immunisierung von 5XFAD-Mäusen mit NT4X im präventiven Ansatz
- Validierung von löslichem, oligomeren A β pE3-x und A β 4-x als potentiell therapeutisches Ziel zur Intervention gegen den Morbus Alzheimer

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Kits und genutzte technische Apparaturen

In der Tabelle 2.1 sind die in dieser Doktorarbeit genutzten Chemikalien aufgeführt. In der Tabelle 2.2 sind die genutzten Reagenzien und Lösungen zu finden, die vorgefertigten Kits erscheinen in der Tabelle 2.3 und die verschiedenen technischen Maschinen sind in der Tabelle 2.4 zu finden. Andere Hilfsmittel sind in der Tabelle 2.5 zusammengefasst.

2.1.2 Antikörper

Die in der Grundimmunisierung, der Immunhistochemie und den Western Blots genutzten primären Antikörpern sind in der Tabelle 2.6 aufgeführt. In der Tabelle 2.7 sind alle sekundären Antikörper, die für die Western Blots und Immunhistochemie genutzt wurden, aufgelistet.

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
0,5% Tween (Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Ameisensäure (Methansäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Applichem GmbH, Darmstadt
Ethanol 99% vergällt	Chem Solute GmbH & Co.KG, Renningen
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ketamin 10%	Medistar GmbH, Ascheberg, Deutschland
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl (Kochsalz)	Carl Roth, Karlsruhe
Parahydroxycoumarin	Carl Roth, Karlsruhe
30% D(+)-Saccharose-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
TBS (Tris Buffered Saline)	Merck, Darmstadt
Thioflavin S	Sigma Aldrich Chemie, Steinfurt

Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Merck, Darmstadt
Triton (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe
Xylazin	Xylarium, Ecuphar NV/SA, Oostkamp, Belgien

Tabelle 2.2: Reagenzien und Lösungen

Reagenzie	Hersteller
100 bp DNA Ladder (PCR Marker)	Bioron GmbH, Ludwigshafen
Agarose Gel für Western Blots	anamed Elektrophorese GmbH, Gross-Bieberau
Color Protein Standard Broad Range P7712S (Western Blot Marker)	New England Biolabs inc., Ipswich, MA, USA
dH ₂ O (UltraPure Filtered Water)	aus Bayer AG bezogen
dNTPS (Deoxynukleosidtriphosphate)	Peqlab GmbH, Erlangen
FCS (Fetal Cow Serum)	Biochrom GmbH, Berlin
HD Green Plus DNA Stain	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe
Lysepuffer	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Axon Laboratories, Stuttgart
PBS (Phosphate Buffered Solution)	Biochrom GmbH, Berlin
A β -Peptide	Peptide specialty laboratories GmbH, Heidelberg
Primer 1 happ for (5'3' Sequenz CATGACCTGG-GACATTCTC)	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer 2 happ rev (5'3' Sequenz GTAGCAGAG-GAGGAAGAAGTG)	Eurofins Genomics, Ebersberg
Proteinkinase K	Peqlab GmbH, Erlangen

Roti Histofix (4%igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung)	Carl Roth, Karlsruhe
Roti Histokit (Synthetisches Einbettmedium)	Carl Roth, Karlsruhe
Running Buffer (Vario Gel Tricin Laufpuffer)	anamed Elektrophorese GmbH, Gross-Bieberau
SDS Dye	anamed Elektrophorese GmbH, Gross-Bieberau
Taq Polymerase	Axon Laboratories, Stuttgart
TBE Puffer (Tris-Borat EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Transfer Buffer (300 mM Tris, 2,4 M Glycin, pH 8,3)	anamed Elektrophorese GmbH, Gross-Bieberau

Tabelle 2.3: Kits

Kit	Hersteller
DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Kit	Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA
VECTASTAIN ABC (Avidin/Biotin) Kit	Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA

Tabelle 2.4: Maschinen

Maschine	Hersteller
MP-300V (Power Supply)	Major Science, Saratoga, CA, USA
GFL 3016 und 3012 Taumelschüttler	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Blue Cube 300	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Wärmeschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heudolph DUOMAX 1030 Schwenker	EICH, Bonn
HOEFER Semiphor Transfer Unit	Hofer Pharmacia biotech, San Francisco, CA, USA
Lab cycler	SensoQuest, Hamburg
LEICA EG 1140H Paraffin-Einbettungs-Station	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar

LEICA EG1140C HistoCore Arcadia C - Cold Plate	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
LI - Cor Odyssey Imaging System	LI - Cor Biotechnology Lincoln, NE, USA
MEDAX Wärmebad	Nagel GmbH, Kiel
Microm HM 335	Microm, Walldorf
Nanodrop One	Thermo Scientific, Madison, WI, USA
Navigator Waage	OHAUS Europe GmbH, Greifensee, Schweiz
NN-E201 WM Mikrowelle	Panasonic, Kadoma, Japan
Olympus BX51 Mikroskop	Olympus, Shinkuju, Japan
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
TP 1020 Tissue Processor	Leica Biosystems, Nussloch
UNO - Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc. Bohemia, NY, USA

Tabelle 2.5: Hilfsmittel

Hilfsmittel	Hersteller
Blotkammer für Western Blot	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Eppendorf Gefäß	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Gelelektrophorese Kammer für PCR	Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Immun-Blot PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran	Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Omnican F 1 ml Einmal-Feindosierungsspritzen	B. Braun, Melsungen
Pap Pen - Lipidstift	Kisker Biotech, Steinfurt
PCR-Gefäße	(Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich)
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rotilabo-Einbettkassette aus Polyoxymethylen	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpell Feather S35	Feather Safety Razor Co. Ltd, Köln
100 Sterican 0,90 x 70 mm Kanüle	B. Braun, Melsungen
Thermo Scientific Menzel Gläser Superfrost Plus und Deckgläser	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Tabelle 2.6: Primäre Antikörper

Name	Gewonnen	Isotyp	Gegen	Hersteller	Konzentration
NT4X	Maus	Monoklonal	A β p1-42, A β pE3-x, A β 4-x	AG Bayer	I, WB(1:100), IH (1:500)
1-57	Maus	Monoklonal	A β pE3-x	AG Bayer (Antonios et al. 2013)	I, WB(1:1000), IH (1:500)
9D5	Maus	Monoklonal	A β pE3-x	AG Bayer (Venkataramani et al. 2012)	I, WB(1:1000)
24311	Hase	Polyklonal	panA β	AG Bayer (Bouter et al. 2013)	IH (1:500)
80C2	Maus	Monoklonal	A β 1-x	Synaptic Systems, Göttingen	IH (1:500)
029-1	Meerschweinchen	Monoklonal	A β 4-X	generiert in AG Bayer	IH (1:500)
GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)	Maus	Polyklonal	Neuroinflammation	Chemicon International, Temecula, CA, USA	IH (1:500)
Doublecortin	Ziege	Polyklonal	Doublecortin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	IH (1:500)
Biosimilar (BS) Solanezumab	humanisiert	Monoklonal	Mittlere A β Domäne	Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA	IH (1:500)

Die primären Antikörper wurden für die Immunisierung (I), Immunhistochemie (IH) und Western Blots (WB) genutzt.

Tabelle 2.7: Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper wurden für die Immunhistochemie (IH) und Western Blots (WB) benutzt.

Name	gewonnen aus	Verbindung	Hersteller	Einsatz/Konzentration
Anti Rabbit	Schwein	biotinyliert	Jackson Immuno-research Laboratories, Inc., Suffolk, UK	IH (1:200)
Anti Mouse	Hase	biotinyliert	Jackson Immuno-research Laboratories, Inc., Suffolk, UK	IH (1:200)
Anti Mouse	Ziege	HRP (horseradish peroxidase)	Jackson Immuno-research Laboratories, Inc., Suffolk, UK	WB (1:30000)
Anti Guinea Pig	Esel	biotinyliert	Jackson Immuno-research Laboratories, Inc., Suffolk, UK	IH (1:200)

2.1.3 Tiere

Alle für diese Arbeit verwendeten Mäuse waren Zugehörige der Spezies der Hausmaus (*Mus musculus*). Den Vorgaben der „Gesellschaft für Versuchstierkunde“ (GV-SOLAS) sowie der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA) wurde bei der Behandlung strikt Folge geleistet. Die Experimente wurden von dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt

2.1.3.1 **Haltungsbedingungen**

Die Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Tiere verbrachten ihr Leben in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen. Dabei teilten sich bis zu sechs Mäuse einen individuell ventilierten Käfig mit den Abmessungen 32 cm Länge x 15 cm Breite x 14,5 cm Höhe. Selbstverständlich waren ihnen Wasser und Futter zu jeder Zeit frei zugänglich.

2.1.3.2 **Immunisierungsprotokoll**

Die für die Quantifizierung des Plaque Loads genutzten Tiere wurden allesamt nach einem festen Immunisierungsprotokoll behandelt.

Immunisierungsprotokoll 5XFAD-Mäuse:

Tiere: 34 5XFAD-Weibchen (8 bzw. 9 pro Gruppe)

Start Immunisierung: 6 Wochen

Immunisierungsdauer: 12 Wochen (wöchentliche intraperitoneale Injektionen; 10 mg/kg Körpergewicht)

Genutzter Antikörper: NT4X

Kontrollen: PBS sowie die beiden A β pE3-x Antikörper 9D5 und 1-57 (siehe Tabelle 2.6).

Mit der Kenntnis der natürlichen Entwicklung der 5XFAD-Maus (vgl. Absatz 1.7) konnte mithilfe dieses Schemas ein präventiver Behandlungsansatz des NT4X erforscht werden. Die Antikörper wurden allesamt in sterilem PBS (pH 7,4) gelöst und die Applikation erfolgte mit der Omnican F 1-ml-Feindosierungsspritze, wobei das Injektionsvolumen 10 ml/kg betrug.

Als Kontrollantikörper wurden die A β E3-x spezifischen Antikörper 1-57 (Antonios et al. 2013) und 9D5 (Venkataramani et al. 2012) verwendet. Die Immunisierung wurde von geschultem und befugtem Personal durchgeführt. Leiden, Schmerzen und Unbehagen der Tiere wurden dabei so minimal wie möglich gehalten.

2.1.4 Gewinnung und Präparation der Mäusegehirne

Zunächst wurde die Maus mit einer CO₂-Anästhesie betäubt, bevor sie von hierfür geschultem und zertifiziertem Laborpersonal durch zervikale Dislokation getötet wurde. Im Anschluss wurden die Mäuse auf Eis gelegt und mit einer Schere dekapitiert. Haut und subkutanes Gewebe wurde entlang der dorsalen Mittellinie des Schädels eingeschnitten und vom Schädel gelöst. Nun wurde die Schädelkalotte in sagittaler Schnitfführung entlang der Pfeilnaht (*Sutura sagittalis*) mit einer chirurgischen Schere getrennt. Außerdem erfolgten Schnitte am rechten und linken Schläfenbein (*Os Temporale*), sodass das Schädeldach mit einer Pinzette angehoben werden konnte. Vorsichtig wurde mit einem Spatel nun das Gehirn aus dem Schädel befreit und anschließend mit einem Skalpell in die beiden Hemisphären geteilt.

Nun wurde die rechte Hemisphäre in eine Rotilabo-Einbettkassette aus Polyoxymethylen platziert, die für 72 Stunden bei 4 °C in Rotihistofix (einer 4%igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung) gelagert wurde.

Im Anschluss konnte das Gewebe in Paraffin fixiert werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Nachweis des 5XFAD-Genotyps

Zum Nachweis des 5XFAD-Genotyps erfolgte bei jedem der 34 Versuchstiere eine Schwanzbiopsie zur DNA Gewinnung mit anschließendem Nachweis der APP-Mutation. Dies erfolgte durch Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte via PCR (Polymerase Kettenreaktion) und darauffolgender Gelelektrophorese.

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsie

Das Biopsat aus dem Mausschwanz wurde zunächst in ein markiertes Eppendorf Gefäß gegeben und mit 200 µl Lysepuffer versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von ca. 20 Stunden bei 56 °C im Thermomixer compact von Eppendorf bei 350-450 Umdrehungen/min bis das Gewebe vollständig lysiert war. Danach wurde die Probe 20 Minuten lang bei 4 °C bei 17000 Umdrehungen/min in der Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge abzentrifugiert.

Daraufhin wurde der Überstand der Probe 200 µl kaltem Isopropanol (2-Propanol) hinzupipetiert. Zur Vergewisserung wurden die Proben nun geschwenkt bis das DNA-Präzipat sichtbar wurde. Erneut wurde die Probe zentrifugiert, nun 10 Minuten lang mit 13000 Umdrehungen/min bei Raumtemperatur.

Die Probe wurde jetzt vorsichtig abgegossen und das verbliebene Pellet mit 200 µl kaltem Ethanol gewaschen. Abermals wurde die Probe bei Raumtemperatur und 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde im Anschluss abgegossen und eventuelle Ethanolreste vorsichtig abpipetiert. Das übriggebliebene Pellet wurde für etwa 60 Minuten auf dem UNO-Thermoblock bei 56 °C getrocknet. Nun wurde das Pellet in 30 µl Reinstwasser über Nacht bei 56 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte dann bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C.

2.2.1.2 Nukleinsäure-Quantifizierung

Bevor die Probe für die PCR genutzt wurde, wurde sichergestellt, dass ausreichend DNA in ihr enthalten war und diese eine hohe Reinheit aufwies. Zu diesem Zweck wurde das Nano Drop One Photometer mit der enthaltenen Software C genutzt. Zunächst wurde die Option „dsDNA“ ausgewählt. Der Messarm wurde gereinigt und eine Leeraufnahme mit H₂O wurde gemacht.

Anschließend wurden 2 µl der Probe auf den Messarm gegeben und die Messung erfolgte. Bei einem Extinktionskoeffizienten von über 1,8 für A_{260/280} und A_{260/30} wurde von einer suffizienten Reinheit und Konzentration der DNA-Probe ausgegangen. Im Anschluss wurden die Proben auf eine einheitliche Konzentration von 20 ng/µl mit Reinstwasser verdünnt.

2.2.1.3 Nukleinsäure-Amplifikation via Polymerase-Kettenreaktion

In PCR-Gefäße wurden 2 µl der Probenverdünnung und 18 µl des Mastermixes pipettiert. Dieser bestand aus zwei Primern (vgl. Tabelle 2.2), Deoxynukleosidtriphosphate, Magnesiumchlorid, Reaktionspuffer, Reinstwasser und der Taq-Polymerase.

Alle Inhaltsstoffe und Mengen des Mastermixes sind unter der Tabelle 2.8 zusammengefasst. Anschließend wurde im SensoQuest Lab Cycler nach dem in Tabelle 2.9 aufgeführten Schema das PCR-Protokoll durchgeführt.

Tabelle 2.8: Mastermix

Reagenzie	Volumen
Primer 1 happ for (10 pmol/µl) (vgl. Tabelle 2.3)	0.5 µl
Primer 1 happ rev (10 pmol/µl) (vgl. Tabelle 2.3)	0,5 µl
Deoxynukleosidtriphosphate	2 µl
Magnesiumchlorid (25 mM)	3,2 µl

10x Reaktionspuffer	2 µl
Reinstwasser	9,6 µl
Tag Polymerase	0,2 µl
DNA (20 ng/µl)	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 2.9: PCR-Protokoll

Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	3 min
2	94 °C	45 sec
3	58 °C	1 min
4	72 °C	1 min
5	35-fache Wiederholung der Schritte 2-4	
6	72 °C	5 min
7	4 °C	∞

2.2.1.4 Gelelektrophorese

Um die in der PCR amplifizierte Genabschnitte gelelektrophoretisch differenzieren zu können, wurde ein Agarose-Gel hergestellt. Hierfür wurden zunächst 50 ml von 5x TBE Puffer (bestehend aus 54,5 g/l Tris Base, 27,8 g/l Borsäure und 20 ml 0,5 M Na₂EDTA) mit 200 ml Reinstwasser für Gel und Kammer vorbereitet.

Von dieser Lösung wurden 35 ml mit 0,7 g Agarose gemischt und bei 200 W in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Im Anschluss ließ man das Gel auf 65 °C runterkühlen. Danach wurden 2 µl HD Green Plus DNA Stain hinzugefügt. Nun wurde diese Lösung in einem Gelträger umgefüllt und mit zwei Probenkämme zu jeweils 12 Probenkammern ausgestattet. Falls Blasen entstanden waren, wurden diese nun vorsichtig entfernt.

Es wurde gewartet bis das Gel vollständig unter dem Abzug abgekühlt war. Dann wurde es in eine mit 240 ml von 1x TBE Puffer gefüllte Gelelektrophorese Kammer gelegt. 10 µl der in der PCR (Absatz 2.3.3) gewonnenen DNA-Probe wurden mit 2 µl Ladebuffer gemischt und in die Kammer des Agarose-Gels pipettiert.

Neben dem 100-bp-Marker wurde auch noch jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle hinzugefügt. Dem Gel wurde nun 35 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt.

Schlussendlich wurde das Gel nun mit dem Blue Cube 300 analysiert.

2.2.2 Darstellungen der Bindungsprofile der Antikörper

Um das Bindungsprofil der in der Immunisierung verwendeten Antikörper (NT4X, 1-57 und 9D5, vgl. Tabelle 2.6) zu untersuchen, wurden Western Blots mit synthetischen A β -Peptiden von Peptide Speciality Laboratories angefertigt. Hierfür wurden sowohl vollständiges A β 1-42 als auch N-trunkierte A β pE3-42, A β 4-42 und A β 4-40-Peptide verwendet.

2.2.2.1 Vorbereitung der Peptide

Für den Versuch sollten sowohl „gealterte“ Peptide als auch „frische“ verwendet werden. „Gealterte“ Peptide zeichneten sich durch eine fibrilläre Struktur aus, sodass die Antikörper stärker binden konnten.

Die lyophilisierten Peptide wurden in 10 mM NaOH bei einer Konzentration von 1mg/mL gelöst und in Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Um die Hälfte der Peptide der vier verschiedenen Längen (A β 1-42, A β pE3-42, A β 4-42 und A β 4-40) altern zu lassen, wurden sie über 72 Stunden lang im GFL 3012 Taumelschüttler bei 14 Runden/Minute und 37 °C inkubiert.

2.2.2.2 Western Blots

Zunächst wurden 5 µl eines jeden Peptides mit 5 µl SDS Dye im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Gemisch wurde nun auf dem UNO – Thermoblock für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Währenddessen wurde der Runningbuffer hergestellt. Hierfür wurden 25 ml des Varo Gel Tricin SDS Laufpuffers mit 475 ml Reinstwasser gemischt.

Als Gel fungierte ein 10 Kammern Agarose-Gel von anamed. Vor Benutzung wurde dieses sorgfältig unter fließendem destilliertem Wasser gewaschen und der Kamm wurde herausgezogen.

Nun wurde das Gel in eine SERVA Western Blot Kammern geschoben, die ihrerseits mit dem Runningbuffer gefüllt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Wells des Gels von dem Laufpuffer bedeckt waren. Um sicherzustellen, dass keine Blasen in den Wells sind, wurden diese jeweils einmal auf- und abpipetiert.

Das Gel wurde nun mit den 10-µl-Gemischen des SDS Dye und der gealterten und den frischen Peptiden bestückt. Als Marker dienten 10 µl Color Protein Standard Broad Range P7712S. Die Western-Blot-Kammer wurde nun auch mit dem Runningbuffer angefüllt. Die Kammer wurde an den MP-300V angeschlossen und es wurde für 90 Minuten eine Spannung von 60 V angelegt. Im Anschluss wurde die Spannung für 30 Minuten auf 120 V erhöht.

Das Gel wurde aus der Kammer genommen und erneut mit dH₂O gewaschen. Mithilfe eines Japanmessers wurde das Gel aus der Kassette befreit und die überflüssigen Wells wurden entfernt.

Nun wurde das Gel vorsichtig in den Transfer Buffer gelegt. Filterpapier und PVDF Membran wurden ebenfalls hineingelegt. Die Membran wurde auf ein Filterpapier gelegt und mit einer Rolle wurden etwaige Blasen entfernt. Das Gel wurde auf die Membran positioniert und erneut wurden mit der Rolle die Blasen entfernt. Das zweite Filterpapier wurde auf das Gel gelegt und ein letztes Mal wurde mit der Rolle darüber gefahren.

Das Paket bestehend aus vier Schichten wurde auf die HOEFFER Semiphora Transfer Unit gelegt. Eine Spannung von 25 V wurde für 45 Minuten angelegt.

Die Membran wurde mit TBST für 15 Minuten auf einem Taumelschüttler bei mittlerer Geschwindigkeit bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurde die Membran in ein Gefäß

mit PBS gelegt und für 5 Minuten in die Mikrowelle gestellt. Für ca. 1 Minute bei 800 W bis der Puffer kocht, danach bei 80 W für den Rest der Zeit.

Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Taumelschüttler bei Raumtemperatur mit unspezifischem Block, bestehend aus TBST und 10% Milchpulver.

Danach wurde der primäre Antikörper in TBST gelöst und mit der Membran in eine Plastikbox gegeben. Diese wurde mit Paraffin dicht verschlossen. Über Nacht wurde die Box auf den Taumelschüttler bei 4 °C gestellt.

Am nächsten Tag wurde die Membran zwei Mal für 10 Minuten mit TBST auf dem Taumelschüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Im Anschluss wurde sie für 90 Minuten mit dem sekundären Antikörper (vgl. Tabelle 2.7) bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler bei mittlerer Geschwindigkeit inkubiert. Nachdem die Membran erneut zwei Mal für 10 Minuten in TBST gewaschen wurde, folgte die Auswertung im Li-Cor Odyssey. Hierfür wurde die Membran mit einem Gemisch aus 3ml Solution A (200 ml HCL/Tris + 50 mg Luminol), 300 µl Solution B (11 mg Parahydroxycoumarin + 10 ml DMSO) und 1 µl H₂O₂ behandelt. Zur Auswertung diente die Software Image Studio Version 3.1.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Paraffin-Einbettung der Mäusegehirne

Nachdem die Mäusegehirne gewonnen, fixiert und in Plastik-Einbettkassetten gelegt worden waren, wurden diesen Kassetten im TP 1020 Automatic Tissue Processor zur Dehydrierung und Paraffin-Immersion weiterverarbeitet. Das hier genutzte Protokoll ist in Tabelle 2.10 abgebildet.

Tabelle 2.10: TP-Protokoll

Lösung	Dauer
4% PBS gepuffertes Formalin	5 min
ddH ₂ O	30 min
50 % Ethanol	60 min
60 % Ethanol	60 min
70 % Ethanol	60 min

80 % Ethanol	60 min
90 % Ethanol	60 min
100 % Ethanol	60 min
100 % Ethanol	60 min
Xylol	60 min
Geschmolzenes Paraffin	60 min
Geschmolzenes Paraffin	60 min

Im Anschluss wurden die Hirne mithilfe des LEICA EG 1140H in Paraffinblöcke eingebettet und zum Abkühlen auf dem LEICA EG1140C platziert.

2.2.3.2 Schneiden der Paraffinblöcke

Die Blöcke wurden sagittal mit dem Mikrotom Microm HM 335 auf eine Dicke von 4µm von medial nach lateral geschnitten. Die Schnitte wurden im destillierten Wasser bei 52 °C im MEDAX Wärmebad auf Thermo Scientific Menzel Gläser Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Im Anschluss wurden die Schnitte für etwa 10 Minuten bei 52 °C auf dem Rand des MEDAX getrocknet, bevor sie über Nacht im Heraeus Wärmeschrank bei 37 °C weiter-trockneten.

Es wurde darauf geachtet, dass die verschiedenen Hirne alle ab der gleichen Schnitttiefe aufgezogen wurden.

2.2.3.3 3.3'-Diaminobenzidin-Immunhistochemie

3.3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunhistochemie wurde mit den 4 µm dicken Schnitten (Absatz 2.5.1) durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst zwei Mal für 5 Minuten in Xylol deparaffiniert. Danach erfolgte die Rehydrierung durch das Durchlaufen einer absteigenden Ethanolreihe. Zuerst für 10 Minuten in 100 % Ethanol, dann für 5 Minuten in 95 % Ethanol, dann für 5 Minuten in 70 % Ethanol und schließlich für 1 Minute in destilliertem, deionisiertem Reinstwasser.

Im Anschluss folgte eine Inkubation von 30 Minuten in 200 ml 0,01 M PBS + 2 ml H₂O₂, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Es folgte ein 1 minütiger Waschschriff in Reinstwasser. Zum Aufdecken der Antigenbindungsstellen folgte die Behandlung im 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 800 W für 10 Minuten. Nach etwa 2 Minuten, wenn der Puffer zu kochen begann, wurde die Mikrowelle auf 80 W für den Verbleib der Zeit heruntergeregelt. Danach kühlten die Schnitte für 15 Minuten ab. Es folgte erneut eine Minute in Reinstwasser. Nun wurden die Schnitte für 15 Minuten in 0,01 M PBS + 0,1 % Triton gelegt, um die Membranen permeabel zu machen.

Es folgte eine Minute in reinem 0,01 M PBS. Um auch intrazelluläres A β sichtbar zu machen, wurden die Schnitte für 3 Minuten in 88% Ameisensäure gelegt. Zum Waschen von Resten der Säure folgte zunächst eine Minute 0,01 M PBS und wiederum 5 Minuten in frischem 0,01 M PBS.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, folgte die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 μ l eines Gemisches von 0,01 M PBS, 10 % FCS und 4 % Milchpulvers pro Schnitt. Hierfür wurden die einzelnen Schnitten mithilfe eines Lipidstiftes voneinander abgeschirmt. Nun wurde ohne Waschschriff der primäre Antikörper in einem Gemisch von 0,01 M PBS + 10 % FCS gelöst und wiederum 100 μ l pro Schnitt appliziert (vgl. Tabelle 2.6). So wurden die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag folgten 15 Minuten in 0,01 M PBS + 0,01 % Triton und anschließend 1 Minute in 0,01 M PBS zum Waschen. Nun wurde der sekundäre, biotinylierte Antikörper appliziert (vgl. Tabelle 2.7). Hierfür wurde dieser erneut in 0,01 M PBS + 10 % FCS in einer Konzentration von 1:200 gelöst. Die Inkubation erfolgte im Heraeus-Wärmeschrank bei 37 °C für 60 Minuten.

In der Zwischenzeit wurde die ABC-Lösung mit dem VECTASTAIN ABC Kit vorbereitet, und bis zum Gebrauch bei 4 °C im Kühlschrank gelagert (vgl. Tabelle 2.3).

Für die Schnitte folgte ein 15 minütiger Waschschriff in 0,01M PBS und die darauffolgende Applikation der ABC-Lösung, um ein Verbindungsglied zwischen dem primär-sekundär-Antikörper-Komplex und dem später folgenden DAB-Farbstoff zu schaffen.

Die Schnitte wurden für 90 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank mit der ABC-Lösung inkubiert.

Es folgte erneut ein Waschschriff für 15 Minuten in 0,01M PBS. Mithilfe des DAB-Kits wurde die DAB-Lösung angesetzt. Per Tropfpipette wurde das DAB auf die Präparate gebracht, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Schnitte für den gleichen primären Antikörper

die gleiche Einwirkzeit erhielten (vgl. Tabelle 2.3). Die passende Einwirkzeit wurde im Vorfeld ermittelt, indem so lange unter Sichtkontrolle unter dem Mikroskop ein nicht immunisiertes Gehirn beobachtet wurde, bis keine weiteren Plaques mehr sichtbar wurden. Dann wurde das DAB schnellstmöglich in PBS von dem Objektträger abgewaschen, um unnötige intensive Hintergrundfärbung zu vermeiden.

Im Anschluss folgte ein Waschschriff für 15 Minuten in 0,01 M PBS.

An diesem Punkt konnte die Gegenfärbung mit gefiltertem Hämatoxylin. Dafür wurden die Proben 40 Sekunden mit Hämatoxylin gefärbt, anschließend in deionisiertes Wasser getaucht und danach für 5 Minuten unter laufendem Leitungswasser gewaschen.

Zur Dehydrierung der Schnitte folgte nun die umgekehrte Alkoholreihe. Also wurden die Schnitte 1 Minute in 70 % Ethanol, 5 Minuten in 95 % Ethanol, 10 Minuten in 100 % Ethanol gegeben und anschließend folgte die Behandlung von zwei Mal 5 Minuten in Xylol, um die Lipidstift-Markierung zu entfernen und das folgende Eindeckmedium zu verstärken.

Als Einbettmedium wurden 2 Tropfen Roti Histokitt pro Schnitt genutzt, um die Objektträger mit Menzel-Deckgläsern blasenfrei zu verschließen.

Die Schnitte wurden letztendlich mit dem Olympus BX51 Mikroskop mit angebrachter Kamera untersucht und Fotos wurden unter Verwendung von Moticam 2.0 aufgenommen.

2.2.3.4 Thioflavin-S-Färbung

Thioflavin-S-Immunhistochemie wurde mit den 4 µm dicken Schnitten durchgeführt (Absatz 2.5.1). Hierfür wurden die Schnitte zunächst zwei Mal für 5 Minuten in Xylol deparaffiniert. Danach erfolgte die Rehydrierung durch das Durchlaufen einer absteigenden Ethanolreihe. Zuerst für 10 Minuten in 100 % Ethanol, dann für 5 Minuten in 95 % Ethanol, dann für 5 Minuten in 70 % Ethanol und schließlich für 2x1 Minute in destilliertem, deionisiertem Reinstwasser.

Es folgte unter Lichtabschirmung eine 8-Minuten-Inkubation mit 1% Thioflavin-S-Lösung. Erneut wurde 2x1 Minute mit destilliertem, deionisiertem Reinstwasser gewaschen, jetzt jedoch unter Lichtabschirmung. Für 4 Minuten wurde wiederum unter Lichtabschirmung in der 1 % Thioflavin-S-Lösung inkubiert, bevor die Schnitte zuerst 2x1 Minute in 80 % Ethanol und anschließend in dreimal für eine Minute in Reinstwasser von Thioflavin-Resten befreit wurden.

Die Eindecken unter Menzel-Deckgläsern erfolgte mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid).

2.2.4 Quantifizierung des Plaque Loads

2.2.4.1 Auswahl der Schnitte

Um den Plaque Load der Maushirne objektiv quantifizieren zu können, wurde nach einem festen Schema vorgegangen. Dabei wurde, wie bereits in Absatz 2.2.3.2 erwähnt, darauf geachtet, dass die verschiedenen Gehirne ab der gleichen Schnitttiefe am Mikrotom auf Objektträger gezogen wurden. So konnte sichergestellt werden, dass die durchnummerierten Schnitte innerhalb der verschiedenen Tiere anhand ihrer anatomischen Lokalisation vergleichbar waren.

Für jede einzelne Färbung wurde nun von jedem einzelnen Tier drei Objektträger mit jeweils zwei Schnitten von 4 µm Dicke ausgewählt. Hierbei wurde dafür Sorge getragen, dass zwischen den einzelnen Objektträger ein Abstand von mindestens 16 µm eingehalten wurde. So konnte erreicht werden, dass in der Quantifizierung ein möglichst breiter Bereich betrachtet werden konnte und so ein objektiveres, repräsentativeres Bild des tatsächlichen Plaque Load erzielt werden konnte.

2.2.4.2 Aufnahme der Fotos

Zunächst wurden die 4 µm dicke Schnitte wie in Absatz 2.2.3.3 und Absatz 2.2.3.4 beschrieben, vorbereitet. Dann wurden am Olympus BX-51 mit angebrachter Kamera über die Software Motic Images ver. 2.0 von jedem Präparat drei Fotos aus vorgegebenen Hirnarealen des Kortex geschossen, um hieraus später den Plaque Load bestimmen zu können

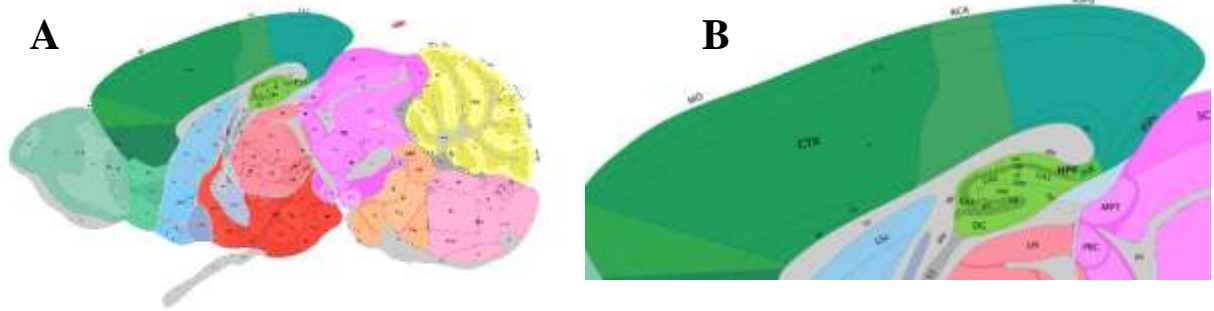


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Mausgehirns im Sagittalschnitt
 (A) Gesamtes Hirn (B) Vergrößerung des Kortex kranial des Hippocampus gelegen.
 Plaque-Load-Quantifizierung erfolgte aus folgenden Regionen.

MO: Somatomotorischer Kortex

ACA: Anteriores cinguläres Areal

RSPd: Retrospleniales Areal dorsaler Teil

(Image credit: Allen Institute.)

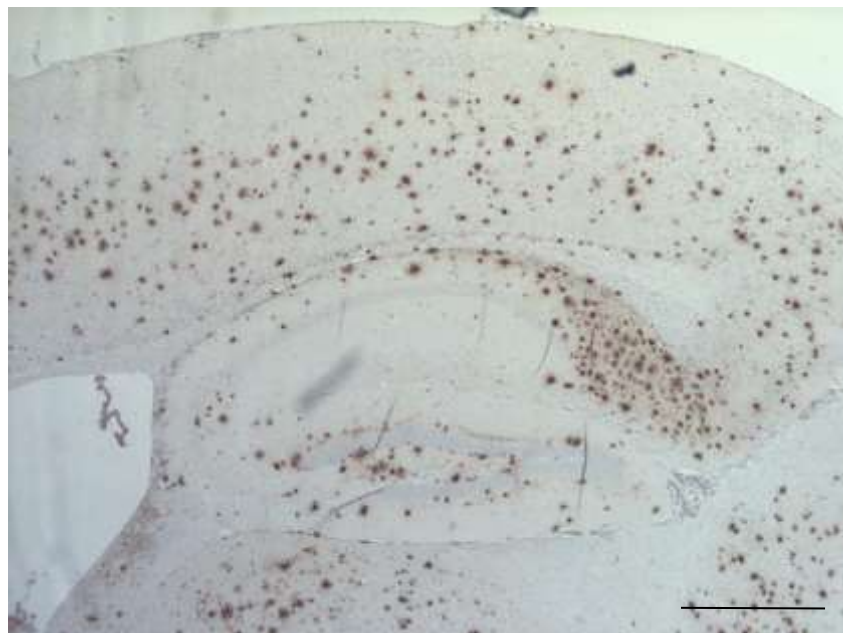


Abbildung 2.2: Foto des Kortex oberhalb des Hippocampus eines 5XFAD-Tieres
 Es handelt sich um eine weibliche, unbehandelte, 12 Monate alte Maus. Hier mit einem
 panAβ-Antikörper und Hämatoxylin-Gegenfärbung aufgenommen.

Maßstab: 500 µm

Antikörper: 24311 (1:500)

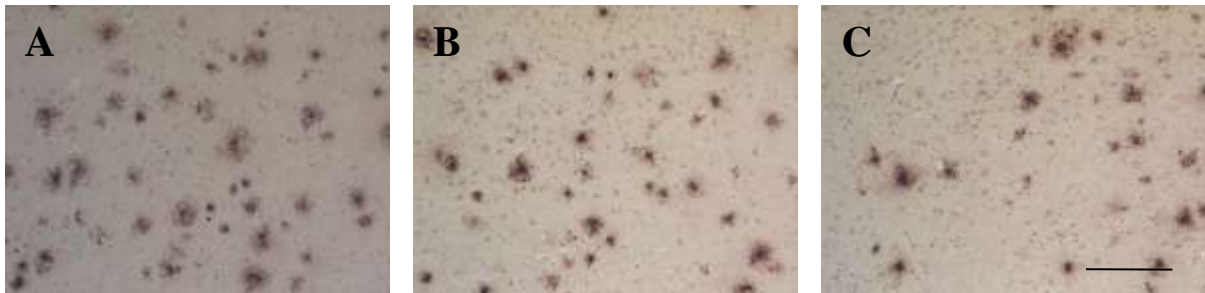


Abbildung 2.3: Kortexfotos in 20x-Vergrößerung

Es handelt sich um das gleiche Tier aus Abbildung 2.2. Gefärbt wurde mit einem panA β -Antikörper und als Gegenfärbung kam Hämatoxylin zum Einsatz.

Die Ausrichtung der Bilder orientiert sich an Abbildung 2.2

A = Somatomotorischer Kortex

B = Anteriores cinguläres Areal

C = Retrospleniales Areal dorsaler Teil

Maßstab: 100 μ m

Antikörper: 24311 (1:500)

Im Groben wurde bei jedem Schnitt wie folgt vorgegangen. Ein Übersichtsbild in 10x-Vergrößerung über den gesamten Hippocampus wurde eingestellt. Anschließend erfolgten von hier aus die für die letztendliche Analyse entscheidenden Fotos in 20x-Vergrößerung. Dabei wurde das erste Foto (vgl. Abbildung 2.3 (A)) genau cranial des Hippocampus aufgenommen. Nun wurde etwa zwei Gesichtsfelder nach rostral verschoben und das zweite Foto aufgenommen (vgl. Abbildung 2.3 (B)). Zuletzt wurde auf das die dorsalste Stelle des Kortexes, oberhalb des Subiculum gestellt und das dritte Foto geschossen (vgl. Abbildung 2.3 (C)).

2.2.4.3 Auswertung der Fotos

Zur Auswertung der in Absatz 2.2.4.2 erhaltenen Fotos und somit zur Quantifikation des Plaque Loads wurde die Software ImageJ v.1.51d genutzt. Von dem subjektiv dunkelsten oder durch Falten schlechtesten Bildes ausgehend wurde ein Schwellenwert bestimmt. Dieser Schwellenwert wurde so gewählt, dass gerade alle Plaques erkannt werden, Hintergrund oder Artefakte aber nicht auftauchten.

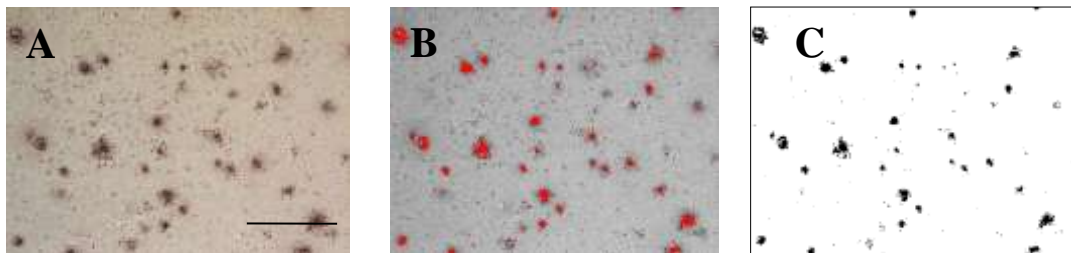


Abbildung 2.4 Kortexfoto für Plaque-Load-Quantifizierung

(A) Foto entspricht Abbildung 2.3

(B) Angepasster Schwellenwert in ImageJ. Plaques erscheinen rot

(C) Plaques erscheinen schwarz, der Hintergrund wurde entfernt (zur besseren Sichtbarkeit umrandet)

Maßstab: 100 μm

Antikörper: 24311 (1:500)

Mit der gleichen Schwellenwerteneinstellung wurde jedes Foto der gleichen Färbung analysiert. Der Prozentwert, den das Programm liefert, wurde gespeichert und in Microsoft Excel kopiert.

Beispielsweise kamen so für die in dieser Arbeit verwendete PBS – Kontrollgruppe, bestehend aus acht Tieren, bei drei verwendeten Objektträgern mit jeweils zwei Schnitten und drei aufgenommenen Fotos eine Gesamtzahl von 144 Werten zusammen.

Nun wurde der Mittelwert für jedes der drei Areale pro Tier bestimmt, sodass für jedes Tier einer jeden Gruppe drei Werte in die Analyse eingehen konnten.

Die Mittelwerte wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert, sodass diese als 100 % erschien.

2.2.4.4 Fluoreszenzaufnahmen

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Olympus BX-51-Mikroskop mit angebrachter Kamera gemacht. Um die Bilder zu generieren, wurde der im Olympus BX-51-System enthaltene Brenner genutzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die 200 Stunden andauernde Lebenszeit des Brenners niemals überschritten wurde. Die Fotos wurden mit Moticam 2.0 aufgenommen.

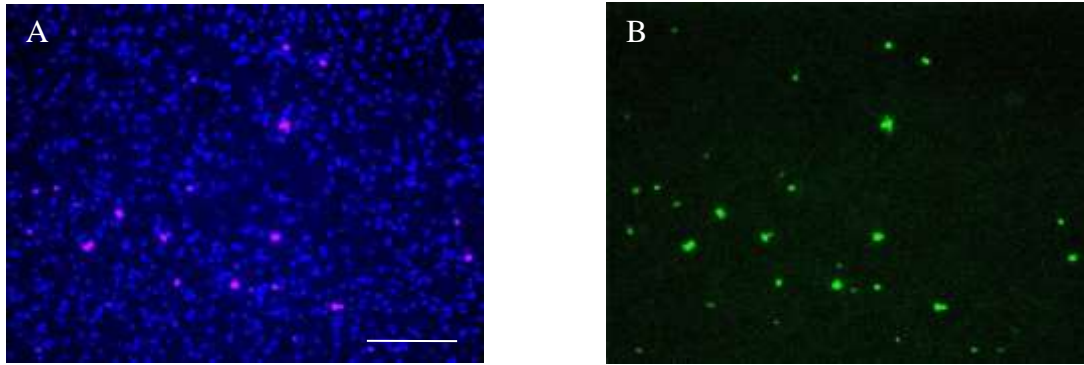


Abbildung 2.5: Thioflavin- und DAPI-Darstellung in einer 18 Wochen alten 5XFAD-Maus

(A) DAPI-Färbung (blau) zeigt alle Zellkerne. Die Plaques werden dabei durch das Thioflavin gefärbt und wurden zur besseren Sichtbarkeit nicht in grün, sondern rot gezeigt und darüber gelegt.

(B) Thioflavin-Filter: die Plaques sind grün.

Diese Darstellung wurde auch zur Quantifizierung der Plaques verwendet (vgl. Absatz 3.6.5).

Maßstab: 100 μm

Thioflavin wurde in einer 1% Lösung verwendet.

2.2.5 Doublecortin – Quantifizierung

Für den in dieser Arbeit durchgeführten Meander Scan wurden Schnitte von 4 μm Dicke mit dem Antikörper Doublecortin (vgl. Tabelle 2.6) wie in Absatz 2.2.3.3 beschrieben angefärbt. Gearbeitet wurde mit dem BX-51 von Olympus mit angebrachter Kamera, sowie einem motorisierten Objektisch und der Software Stereo Investigator.

Zunächst wurde der Gyrus Dentatus in einer 4x-Vergrößerung aufgesucht und markiert. Anschließend wurde in 100x-Vergrößerung unter Zuhilfenahme eines Immersionsöls jede vom Doublecortin angefärbte Zelle gezählt.

2.2.6 Subjektives +/- System bei humanen Schnitten

Anders als beim Maushirn, wo man sich immer am Hippocampus orientieren konnte, ist das menschliche Gewebe untereinander von der Lokalisation nicht vergleichbar bzw. lässt keinerlei Orientierung zu. Daher wurde zusätzlich zur objektiven Plaque-Quantifizierung auch noch diese subjektive Quantifizierung angewandt.

Hierbei wurde unter dem Mikroskop über den gesamten Schnitt gefahren und nach dem subjektiven Eindruck bezüglich der Anzahl der angefärbten Gefäß und Plaques eine Bewertung gegeben. Diese Bewertung schlüsselte sich wie folgt auf:

0 – keine Plaques/Gefäße

(+) – 1 Plaque/Gefäß im gesamten Präparat

+ - Einige Plaques/Gefäße im gesamten Präparat

++ - Viele Plaques/Gefäße im gesamten Präparat

+++ - Extrem viele Plaques/Gefäße im gesamten Präparat

Ferner möchte ich an dieser Stelle anmerken dass das Projekt von der lokalen Ethikkommission geprüft und positiv bewertet worden ist.

Zusätzlich ist zu betonen, dass die Spender zu Lebzeiten ihre Einwilligung in die Verwendung der Gewebe für die Forschung gegeben haben.

2.2.7 Statistik

Alle erhaltenen Daten wurden mit GraphPad Prism ausgewertet und dargestellt. Für den Vergleich zweier Gruppen wurden paarige t-Tests genutzt.

Das Signifikanzniveau wurde für jede Analyse wie folgt festgesetzt:

$p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$.

Alle abgebildeten Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (Standard Error of the Mean – SEM) dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Tierzahl (n) sind unter den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Genauere Informationen zu jeder einzelnen Analyse werden in dem Ergebnisteil dargestellt.

2.2.8 Software

Die für diese Arbeit genutzte Software Programme sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Software

GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Image Studio Version 3.1	LI-COR, NE, USA
ImageJ 1.51f	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Microsoft Office 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA
Motic Images ver. 2.0	Motic Asia, Kowloon, Hongkong
Software C Photometer	Thermo Scientific, Madison, WI, USA
Stereo Investigator	MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA

Alle gezeigten Abbildungen dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders kenntlich gemacht, mithilfe dieser Programme erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Humanes Gewebe

Das in dieser Arbeit genutzte Humangewebe stammt von der niederländischen Hirnbank (<https://www.brainbank.nl>). Alle Patienten hatten zu Lebzeiten eingewilligt, ihr Gewebe der Forschung zu spenden. Das Projekt wurde von der Göttinger Ethikkommission der UMG abgesegnet und ist unter der Antragsnummer 12/1/15 zu finden. Die Liste aller verwendeten Patienten-Gewebe ist in Tabelle 3.1 zu finden.

Tabelle 3.1: Humanes Gewebe

Fall	Reisberg	Alter bei Erstsymptomen	Todesalter	Post mortem Verzögerung	Geschlecht	Braak Stage	ApoE
AD-1	7	73	79	04:15:00	f	5C	33
AD-2	6	67	82	04:35:00	f	5C	43
AD-3	6	67	84	06:30:00	f	5C	43
AD-4	6	72	79	05:20:00	f	4B	43
AD-5	6	81	86	05:40:00	f	6C	44
AD-6	7	53	70	08:18:00	f	6C	33

Es ist anzumerken, dass alle verwendeten Gewebe aus weiblichen sporadischen Alzheimer-Patientinnen stammen.

3.1.1 Die Reisberg-Skala

Die Reisberg-Skala ist eine Evaluierung der vorliegenden Demenz anhand von klinischen Symptomen (Reisberg et al. 1982). Die Skala reicht von 1-7, wobei die Schwere der Demenz mit aufsteigender Zahl zunimmt. Schwere Demenz (6) bzw. sehr schwere Demenz (7) werden dabei weiter unterteilt in a,b,c,d,e für 6 und a,b,c,d,e,f für 7. Besonderes Augenmerk wird in der Reisberg-Skala auf alltagsspezifische Handlungen, wie beispielsweise Waschen, Essen und sich Ankleiden gelegt.

Wie aus der Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, handelt es sich bei den Patientinnen in dieser Arbeit allesamt um schwere bis sehr schwere Alzheimerfälle.

3.1.2 Braak-Stadien

Die Braak-Stadien stellen eine klinische und wissenschaftliche Alzheimerereinteilung anhand von autopsischen Erhebungen dar (Braak 1991). Dabei wird vor allem auf die histopathologische Ausbreitung der intraneuronalen neurofibrillären Bündel geachtet. Die Einteilung umfasst dabei 6 Stadien. Bei Stadium 1 und 2 beschränkt sich die Ausbreitung der neurofibrillären Bündel auf die transentorhinalen Schichten. Bei Stadium 3 und 4 erstrecken sich die neurofibrillären Bündel zusätzlich über den gesamten entorhinalen Kortex und zu Teilen auf das Ammonshorn. In Stadien 5 und 6 sind alle isocorticalen Regionen betroffen.

Ähnlich wie die Reisberg-Skala zeigen also auch die Braak-Stadien, dass das in dieser Arbeit verwendete humane Gewebe von sehr schwer erkrankten Patientinnen stammte.

3.1.3 Die verwendeten Antikörper

Ziel dieses Versuches war es, das Bindungsverhalten des NT4X in menschlichem Gewebe darzustellen. Als Vergleich wurde der panA β -Antikörper Biosimilar Solanezumab (BS) verwendet (Bouter et al. 2015).

3.1.3.1 NT4X

Der NT4X (N-truncated A β 4-X) ist ein muriner IgG2b-Antikörper, der vor allem gegen die verkürzten A β -Varianten A β 4-x, A β pEx-3 und nur schwächer gegen das Volllänge-A β 1-42 (Siehe Absatz 3.3.) gerichtet ist (Bouter et al. 2015). Dabei erkennt er vor allem die oligomeren Konformationen der Peptide.

Für den in dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde nach dem in Absatz 2.2.3.3 beschriebenen Färbeprotokoll vorgegangen, wobei eine Konzentration von 1:500 verwendet wurde.

3.1.3.2 Solanezumab

Bei Solanezumab handelt es sich um einen in Phase 3 der klinischen Studien gescheiterten Antikörper (Siemers et al. 2016; Honig et al. 2018). Es ein humanisierter IgG1-Antikörper, dessen Epitop sich gegen den zentralen Teil (AS 13-28) des A β richtet, wobei er Monomere erkennt (Bouter et al. 2015)

Für den in dieser Arbeit durchgeführten Versuch wurde nach dem in Absatz 2.2.3.3 beschriebenen Färbeprotokoll vorgegangen, wobei eine Konzentration von 1:500 verwendet wurde.

3.1.4 Die subjektive +/- Methode

Wie in Absatz 2.2.10 beschrieben, wurden die Präparate unter 4x- und 10x-Vergrößerung betrachtet und je nach Plaquemasse mit einer Note bewertet. Unter Tabelle 3.2 sind die Werte für die in dieser Arbeit verwendeten Patienten angegeben.

Tabelle 3.2: +/- System

Fall	NT4X (Plaques/Gefäß)	Solanezumab (BS) (Plaques/Gefäß)
AD-1	(+)/+	+/+

AD-2	+/+	+++/+
AD-3	0/+	+++/**
AD-4	(+)/**	+++/**
AD-5	+/+	**/+
AD-6	0/+	+++/+

Es ist auf einen Blick zu erkennen, dass Solanezumab (BS) über alle Präparate hinweg mehr Plaques und GefäÙe erkennt. Der NT4X erkennt GefäÙe deutlich besser als Plaques.

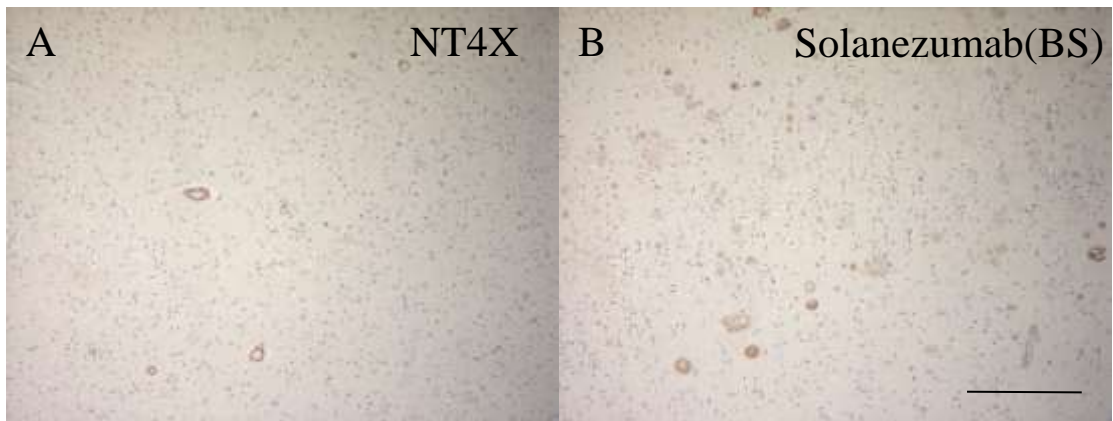


Abbildung 3.1: NT4X im Vergleich zu Solanezumab (BS) im menschlichen Gewebe

Es handelt sich um Gewebe des gleichen Patienten mit Hämatoxylin-Gegenfärbung.

(A) NT4X hat eine minimale Plaque-Detektion, bei moderater GefäÙerkennung.

(B) Solanezumab hat eine hohe Plaque-Detektion, bei ebenso hoher GefäÙerkennung

MaÙstab: 200 µm

Antikörper: NT4X (1:500), Solanezumab (1:500)

Der Abbildung 3.1 ist zu entnehmen, dass rein subjektiv Solanezumab (BS) im Vergleich zu NT4X deutlich mehr GefäÙe und um ein Vielfaches mehr an Plaques erkennt.

In der folgenden Abbildung 3.2 wurde dieser Eindruck als Kreisdiagramms dargestellt

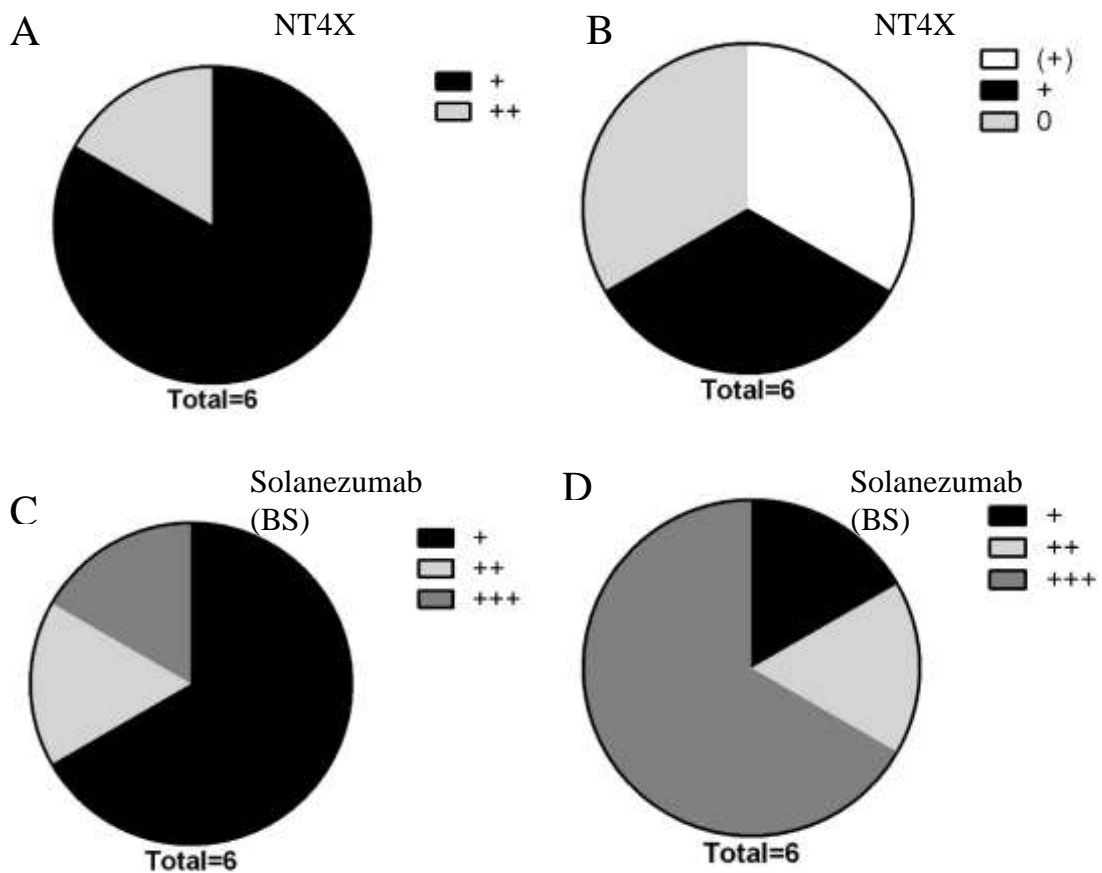


Abbildung 3.2: Kreisdiagramme des +/- Systems der humanen Schnitte

(A) Gefäße mit NT4X angefärbt.

(B) Plaques mit NT4X angefärbt.

(C) Gefäße mit Solanezumab (BS) angefärbt.

(D) Plaques mit Solanezumab (BS) angefärbt.

Die Visualisierung veranschaulicht, dass NT4X Gefäße stärker als Plaques erkennt, im Gesamtbild jedoch, besonders bei den Plaques, weit hinter dem panA β -Antikörper Solanezumab (BS) zurückbleibt.

3.1.5 Objektive Plaque-Quantifizierung

Für die Plaque-Quantifizierung wurde entsprechend Absatz 2.2.4 vorgegangen. Pro Präparat wurden exemplarisch Fotos aufgenommen und analysiert, wie gemäß Absatz 2.2.4.2 durchgeführt wurde. Es wurde lediglich sichergestellt, dass mindestens ein Gesichtsfeld zwischen den einzelnen Fotos lag.

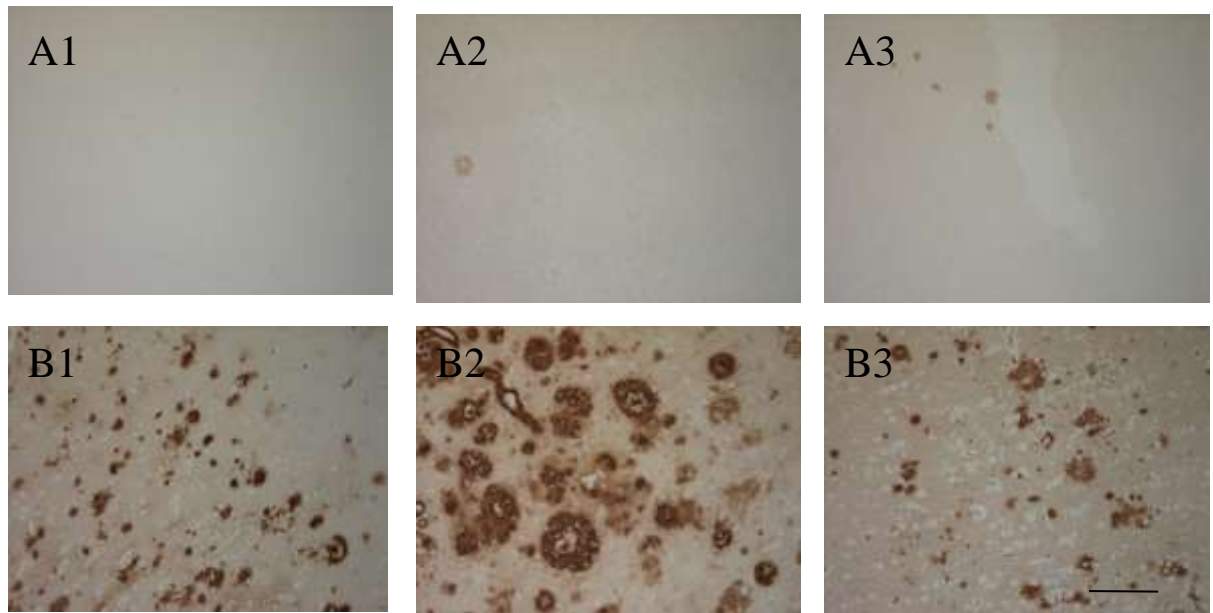


Abbildung 3.3: Beispielfotos des humanen Gewebes für NTX und Solanezumab (BS)

(A1-3) NT4X

(B1-3) Solanezumab (BS)

Maßstab: 100 μm

Antikörper: NT4X (1:500), Solanezumab (1:500)

Die Abbildung 3.3 veranschaulicht sehr gut den Unterschied der beiden zu vergleichenden Antikörper im Hinblick auf ihr Bindungsverhalten zu A β -Plaques in menschlichem Gewebe. Die Quantifizierung ist anhand eines Balkendiagramms in Abbildung 3.4 zu entnehmen.

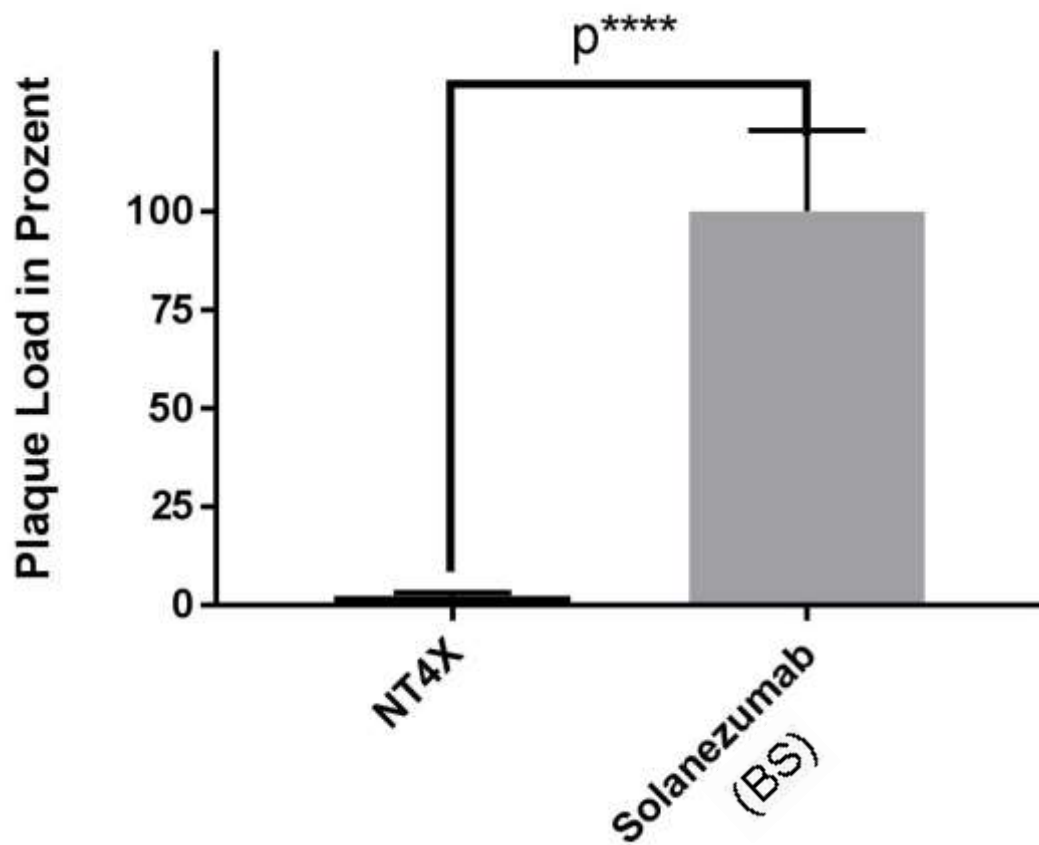


Abbildung 3.4: Quantifizierung der erkannten Plaques NT4X vs. Solanezumab (BS) im humanen Gewebe

Solanezumab (BS) wurde auf 100% der vorhandenen Plaques normalisiert. Im Vergleich dazu erkannte NT4X lediglich etwa 2%.

N=6 für beide Gruppen, $p^{****} < 0,0001$

3.2 Genotypisierung der 5XFAD-Mäuse

Vor der Immunisierung wurde sichergestellt, dass es sich bei den vorliegenden Mäusen um hemizygoten 5XFAD-Mäusen handelt. Hierfür wurden, wie in Absatz 2.2.1 beschrieben, eine PCR und anschließende Gelelektrophorese zum Nachweis des Transgens durchgeführt. Abbildung 3.5 zeigt eine solche exemplarische PCR.

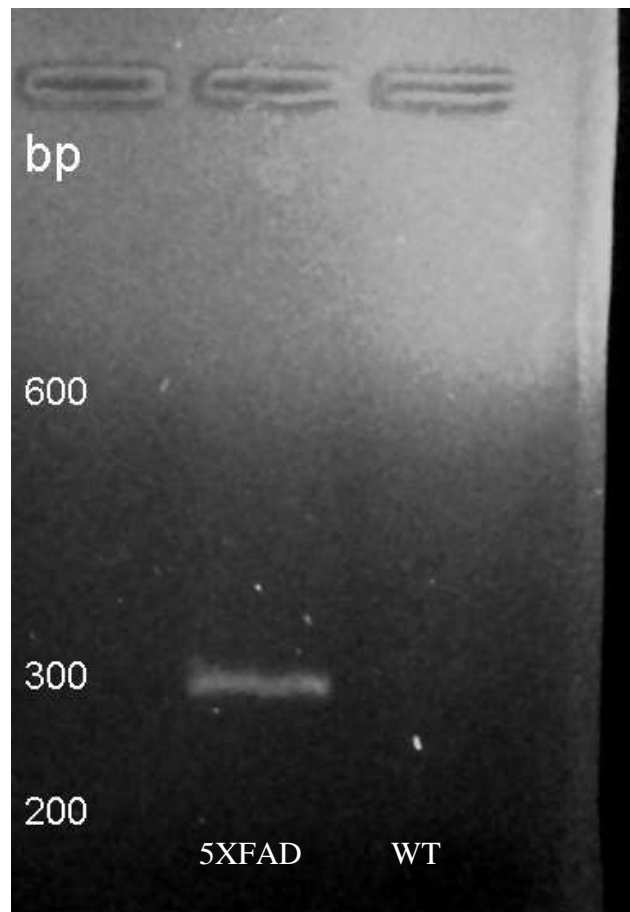


Abbildung 3.5: Gelelektrophoretischer Nachweis des Transgens bei 5XFAD-Mäusen
5XFAD = Maus mit Transgen
WT = Wildtyp

3.3 Western Blot

Die Western Blots wurden zu Identifizierung des genauen Bindungsprofils der in der Immunisierung verwendeten Antikörper wie unter Absatz 2.2.6 durchgeführt.

Für die Versuche wurde sowohl Vollängen-A β 1-42 als auch drei verschiedene N-trunkierte A β , A β pE3-42 und A β 4-42 und A β 4-40 verwendet.

Von diesen vier Peptiden werden sowohl frische als auch gealterte Versionen verwendet (s. Absatz 2.2.2.1).

Der Western Blot für den in dieser Arbeit untersuchten NT4X ist unter Abbildung 3.6 angegeben.

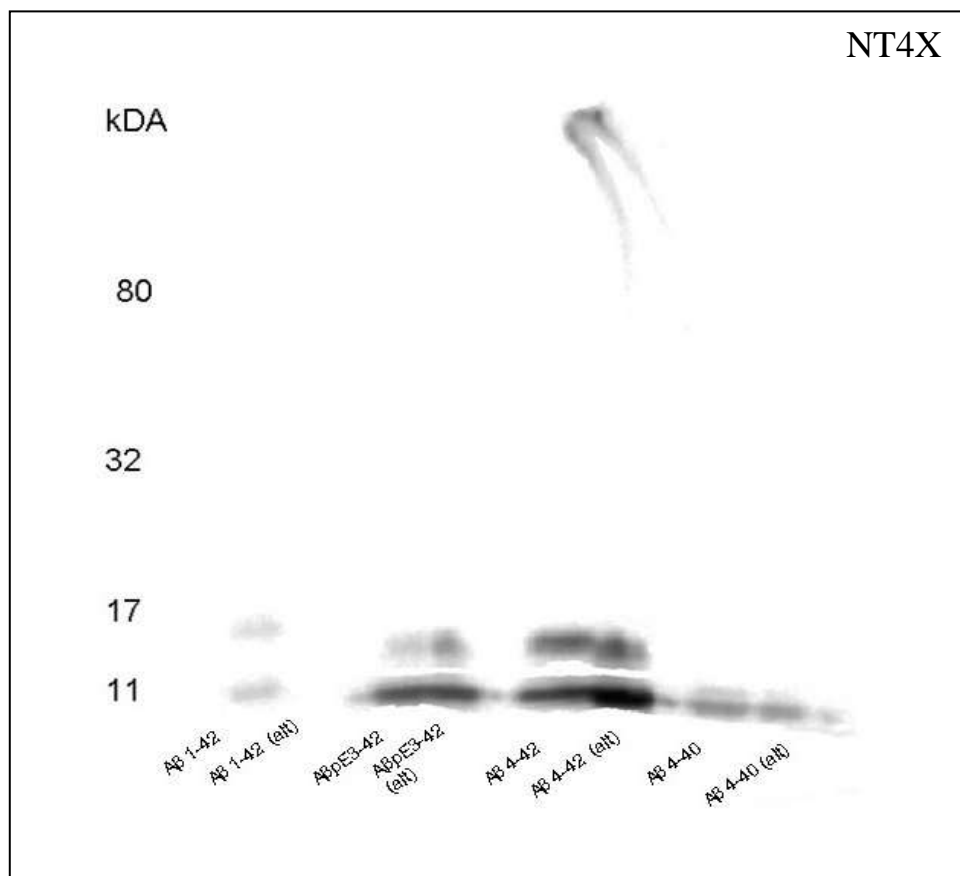


Abbildung 3.6: Bindungsprofil von NT4X

Wie erkenntlich ist, zeigt der NT4X ein breites A β -Bindungsspektrum, welches sowohl Vollängen-A β 1-42 als auch N-trunkiertes A β pE3-42 und A β 4-42 und C-N-terminal trunkiertes A β 4-40 umfasst. Dabei bindet er sowohl an Monomeren als auch an tri- und tetramereischen Oligomeren. Bei dem gealterten A β 4-42 zeigt er außerdem eine Affinität zu höheren molekularen Aggregaten.

Antikörper: NT4X (1:100)

Im Vergleich hierzu ist in Abbildung 3.7 das Bindungsprofil des Kontroll-Antikörpers 1-57 angegeben.

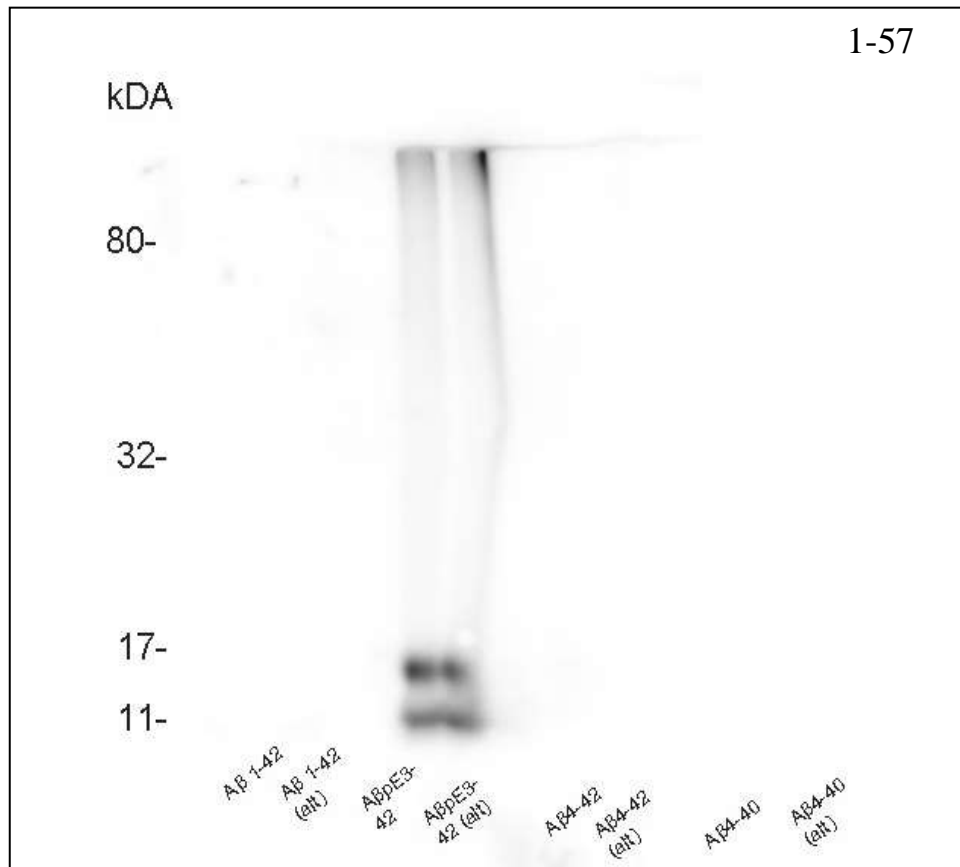


Abbildung 3.7: Bindungsprofil von 1-57

Es ist zu erkennen, dass der 1-57 ausschließlich AβpE3-42 und anders als der NT4X keinerlei Vollängen-Aβ oder Aβ4-42 und Aβ4-40. Er erkennt sowohl Monomere, als auch Oligomere und auch höhere molekulare Aggregate.

Antikörper: 1-57 (1:1000)

Die Western Blots demonstrieren, dass der NT4X ein breiteres Spektrum in seinem Bindungsverhalten zu verschiedenen A β -Peptiden aufweist, als der reine A β pE3-x Antikörper 1-57.

3.4 Inflammation in 5XFAD-Mäusen

Teil dieser Arbeit war es, die Inflammation im Alterverlauf des 5XFAD-Mausmodells zu untersuchen. Hierfür wurden hemizygote drei und neun Monate alte transgene Tiere miteinander verglichen. Die Färbung wurde wie in Absatz 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt, wobei als Antikörper GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) verwendet wurde. GFAP ist das überwiegend vorkommende Intermediärfilament im Cytoplasma in den Gliazellen und hierbei insbesondere in den Astrozyten. Es kann daher als Marker für Astrozytose bei Entzündung angesehen und benutzt werden (Wirhth et al. 2010b).

Im vorliegenden Projekt wurde nach dem in 2.2.4 dargestellten Schema mit n=3 pro Gruppe vorgegangen. Die Fotos wurden wie bereits in Absatz 2.2.4.2 beschrieben aufgenommen. Die drei Monate alten 5XFAD-Mäuse zeigen hier eine geringere Ausprägung der Neuroinflammation, als die neun Monate alten Tiere (s. Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9).

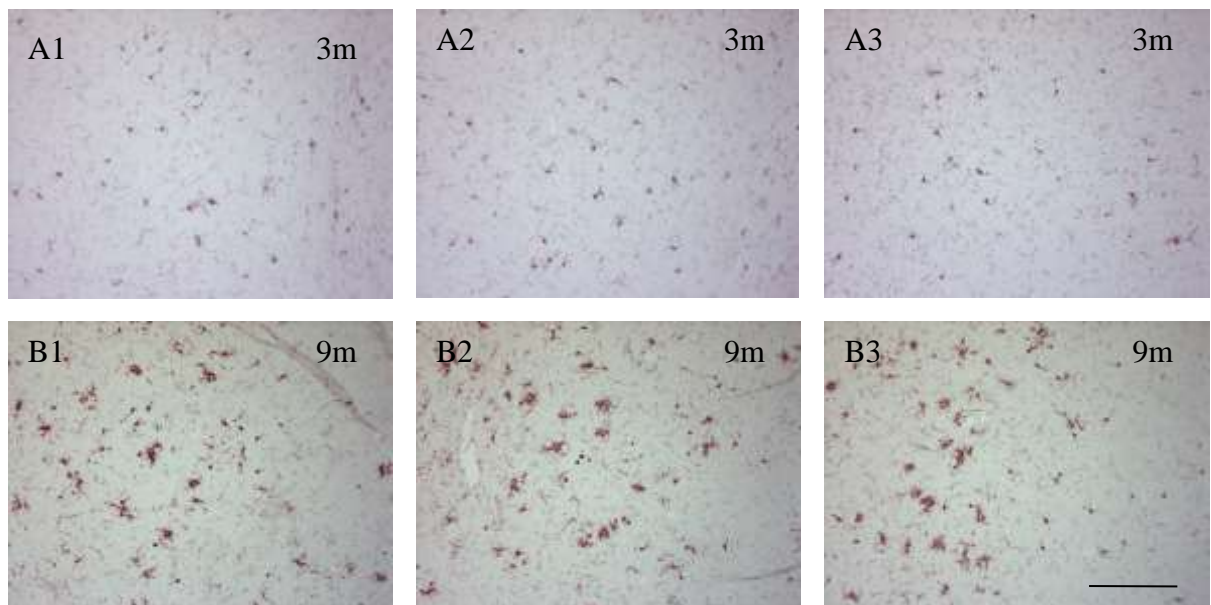


Abbildung 3.8: Vergleich der Neuroinflammation von drei und neun Monate alten 5XFAD-Tieren

(A1-3) Aufnahmen des Kortexes eines drei Monate alten Tieres

(B1-3) Aufnahmen des Kortexes eines neun Monate alten Tieres

Im direkten Vergleich zeigen die neun Monate alten Tiere eine deutlich sichtbare erhöhte Astrozytose im Gegensatz zu ihren jüngeren Artgenossen.

Maßstab: 100 μm

Antikörper: GFAP (1:500)

Wie der A β -Plaque-Load wurde auch die Neuroinflammation anhand der Aufnahmen quantifiziert.

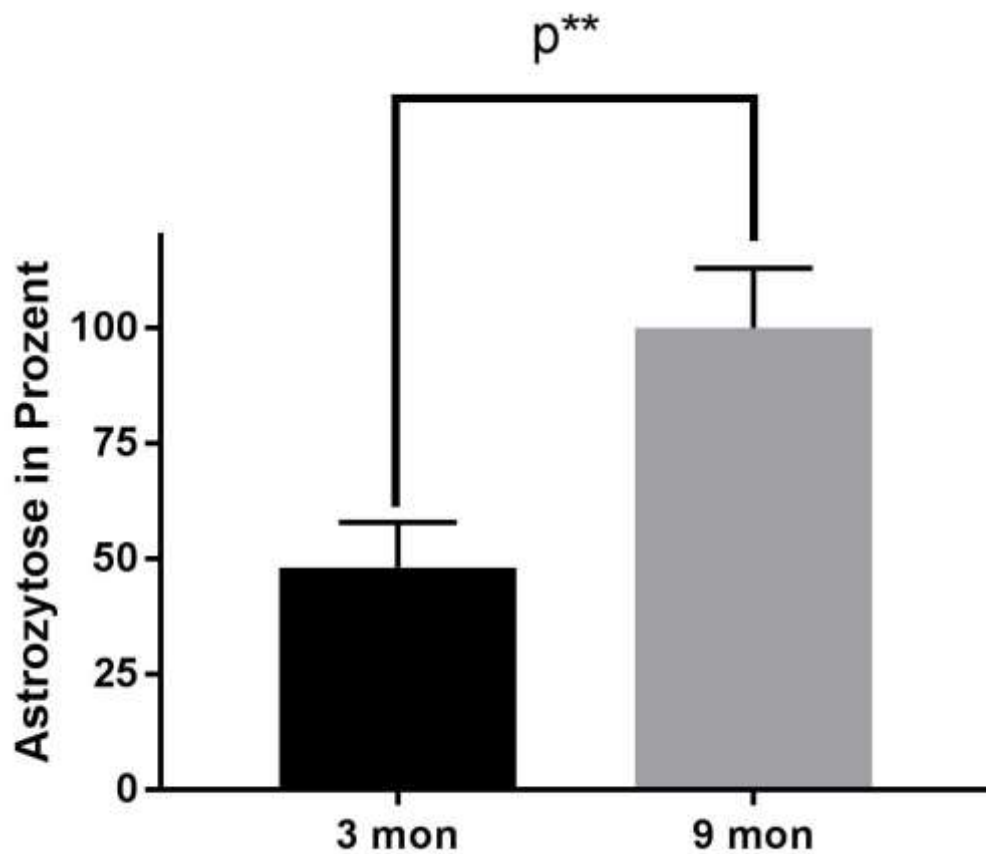


Abbildung 3.9: Ergebnis der Neuroinflammation der unbehandelten 5XFAD-Mäuse
 Die Neuroinflammation ist bei neun Monate alten Tieren im Vergleich zu drei Monate alten Mäusen signifikant etwa doppelt so stark ausgebildet.
 Die Werte für die neun Monatsgruppe wurden auf 100% normalisiert, bei n=3 pro Gruppe, $p^{**}<0,01$.

Das 5XFAD-Mausmodell zeigt eine zum Neuronenzahlverlust und Plaque-Bildung entsprechende Neuroinflammation.

3.5 Neurogenese in 5XFAD-Mäusen

Zur besseren Charakterisierung des 5XFAD-Mausmodells wurde der Einfluss des Alters auf die adulte Neurogenese in diesen Tieren untersucht. Hierfür wurde der Gyrus Dentatus im Hippocampus im Altersverlauf betrachtet und Paraffin-Präparate gemäß Absatz 2.2.3.3 mit dem Antikörper Doublecortin durchgeführt. Alle Schnitte wurden dabei gleich behandelt und erhielten die gleiche Einwirkungszeit im DAB.

Doublecortin ist ein neuronales Migrationsprotein, welches sowohl in der Maus, als auch im Menschen exprimiert wird. Es handelt sich dabei um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches für die Zellteilung in Neuronen wichtig ist und zwei Wochen später herunterreguliert wird (Brown et al. 2003). Daher eignet sich Doublecortin als Marker für die Neurogenese, weil es in reifen Neuronen nicht länger darstellbar ist.

Für den Versuch in dieser Arbeit wurden nun sowohl Wildtyptiere als auch hemizygote 5XFAD-Mäuse im Alter von drei, sechs und zwölf Monaten miteinander verglichen. Dabei bestand jede dieser sechs Gruppen aus drei bis vier Tieren.

Es wurden drei Objektträger mit jeweils zwei Schnitten pro Maus verwendet, um einen guten Überblick über den Gyrus Dentatus zu erhalten.

Die Präparate wurden mit dem Mikroskop, wie unter Absatz 2.2.6 beschrieben, ausgezählt. Im Altersverlauf zeigen 5XFAD-Mäuse eine geringer werdende Neurogenese, die besonders nach 6 Monaten stark absinkt und einen großen Unterschied zur Neurogenese von Wildtyp-Mäusen zeigt (s. Abbildung 3.10 und 3.11).

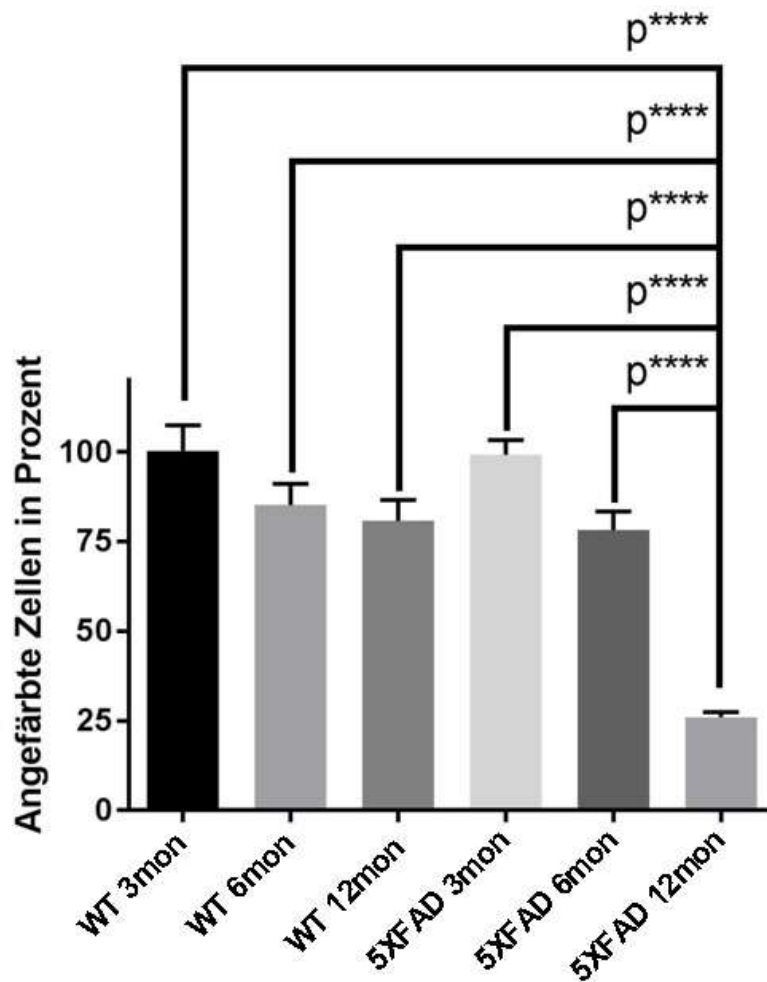


Abbildung 3.10: Ergebnisse der Neurogenese im Alterverlauf zwischen Wildtyptieren und 5XFAD-Mäusen

Innerhalb der ersten sechs Monate gibt es keine Unterschiede zwischen Wildtyptieren und 5XFAD-Mäusen. Zwischen drei und sechs Monaten scheint zwar ein Trend zu bestehen, es reicht jedoch nicht für einen signifikanten Effekt. Zwischen sechs Monaten und zwölf Monaten ist bei den transgenen Tieren jedoch ein stark signifikanter Einbruch bei der Neurogenese festzustellen.

WT drei Monate wurde auf 100% normalisiert, n=3-4 pro Gruppe, p**** < 0,0001.

Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch ein zwölf Monate altes Wildtyptier und eine zwölf monatige 5XFAD-Maus.

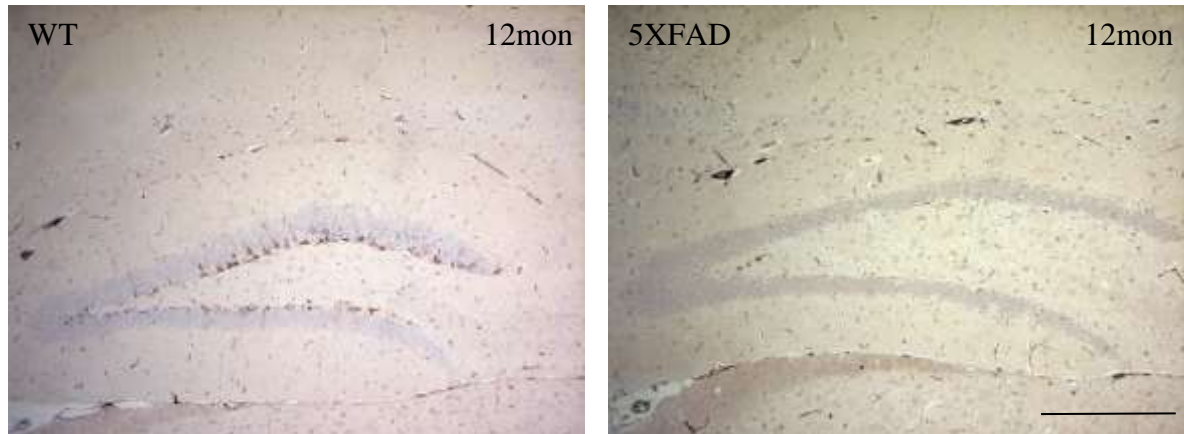


Abbildung 3.11: Beispielbilder der Neurogenese eines 12 Monate alten Wildtyptieres und einer 5XFAD-Maus
Im direkten Vergleich lässt sich die in Abbildung 3.10 gezeigte Signifikanz mit bloßem Auge nachvollziehen.
Maßstab: 200 μ m
Antikörper: Doublecortin (1:500)

3.6 Plaque Load der immunisierten Tiere

Für die folgenden Plaque-Load-Auswertungen wurden stets die gleichen Gruppen von Tieren verwendet. Diese Gruppen setzten sich aus 34 immunisierten, hemizygoten 5XFAD-Mäusen zusammen. Dabei wurden acht Tiere als Kontrolle mit PBS, ebenso acht Tiere mit der IgG-Kontrolle 9D5, neun Tiere mit dem Pyroglutamat-Antikörper 1-57, und ebenso neun Tiere mit NT4X immunisiert.

Die Technik des Färbens (Absatz 2.2.3.3) und besonders der Aufnahme und Auswertung der Fotos (2.2.4.2) wurden bereits ausführlich beschrieben. Im Folgenden wird aus jedem untersuchten Areal jeweils ein Foto gezeigt. Hierbei orientiert sich die Darstellung an der Ausrichtung der schematischen Abbildung 2.2. Das Mittlere Foto entspricht also zentral kranial des Hippocampus (dem Anterioren cingulären Areal/ X2), das linke Foto entspricht dem rostralen Teil des Kortex (dem Motorkortex (X1)) und das rechte Foto entspricht dem dorsalen Teil des Kortex (retrosplenialer Kortex / visueller Kortex (X3)).

3.6.1 panA β -Färbung

Der polykolonale panA β -Antikörper 24311 (Bouter et al. 2013) zeigt anders als das in der Klinik verwendete Thioflavin (vgl. Absatz 3.6.5) nicht nur den Kern der Plaques, sondern auch die Oligomeren, sodass die Plaques sehr groß und weitläufig erscheinen. Er liefert daher einen Einblick in die Gesamtbelastung der A β -Plaques.

Einen signifikanten Effekt auf den gesamten Plaque Load hat keiner der benutzten Antikörper, aber 1-57 zeigt einen Trend zur Senkung (s. Abbildung 3.12 und 3.13).

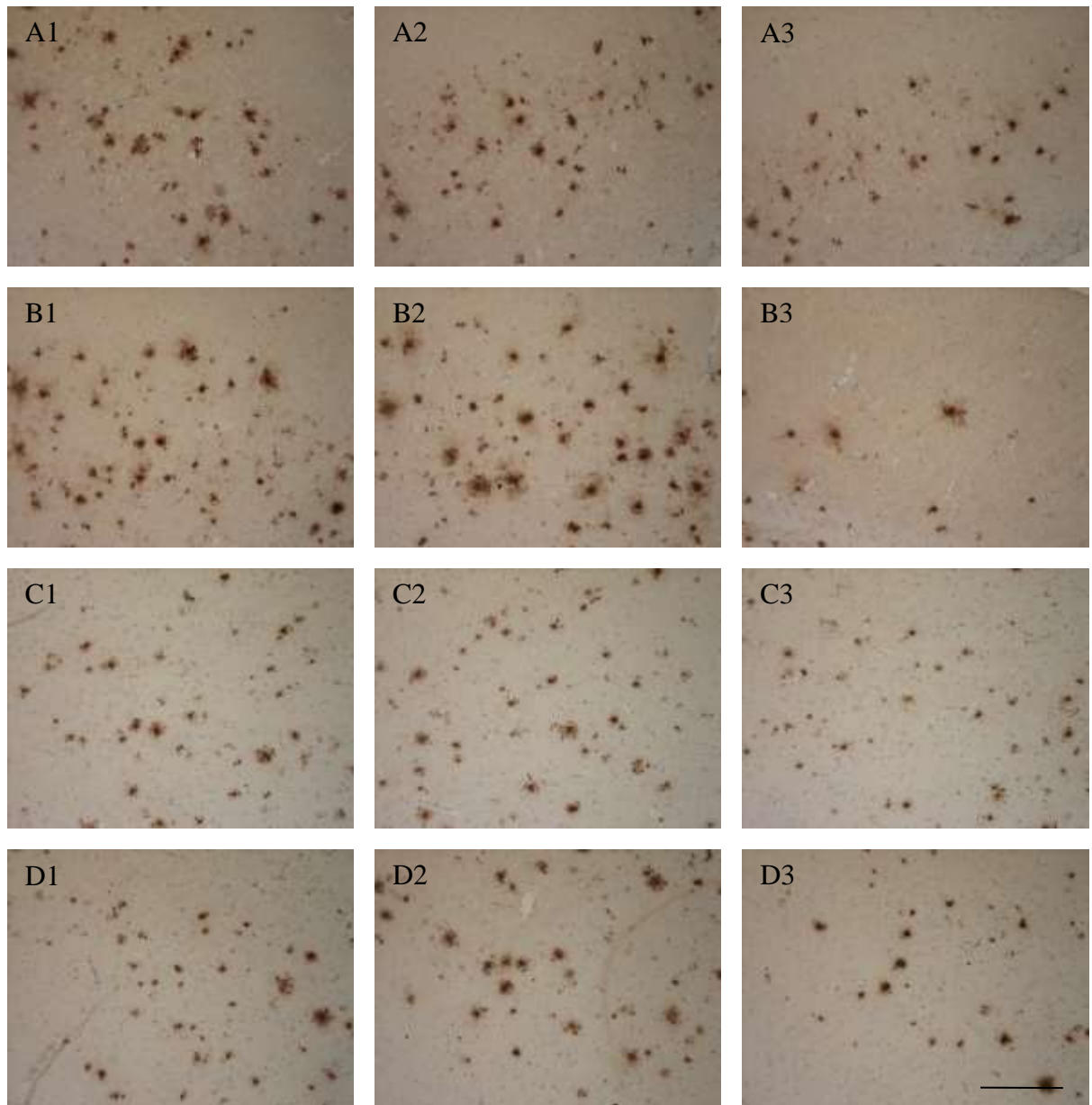


Abbildung 3.12: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in panA β -Färbung
 1 - Somatomotorischer Kortex 2 - Anteriores cinguläres Areal. 3 - retrospleniales Areal (dorsaler Teil)
 (A) = PBS
 (B) = 9D5
 (C) = 1-57
 (D) = NT4X
 Maßstab: 100 μ m
 Antikörper: 24311 (1:500)

Die Bilder zeigen einerseits, dass sich die Plaqueanzahl in den verschiedenen Kortex-Areale unterscheidet. So ist der Plaque Load im somatomotorischen Kortex in allen Präparaten höher als im retrosplenialen oder in späteren Schnitten im visuellen Kortex. Andererseits entsteht der Eindruck, dass die 1-57-Gruppe einen geringeren Plaque Load hat als die anderen, die sich auf einem ähnlichen Niveau bewegen. Dieser Eindruck erhärtet sich in der Quantifizierung.

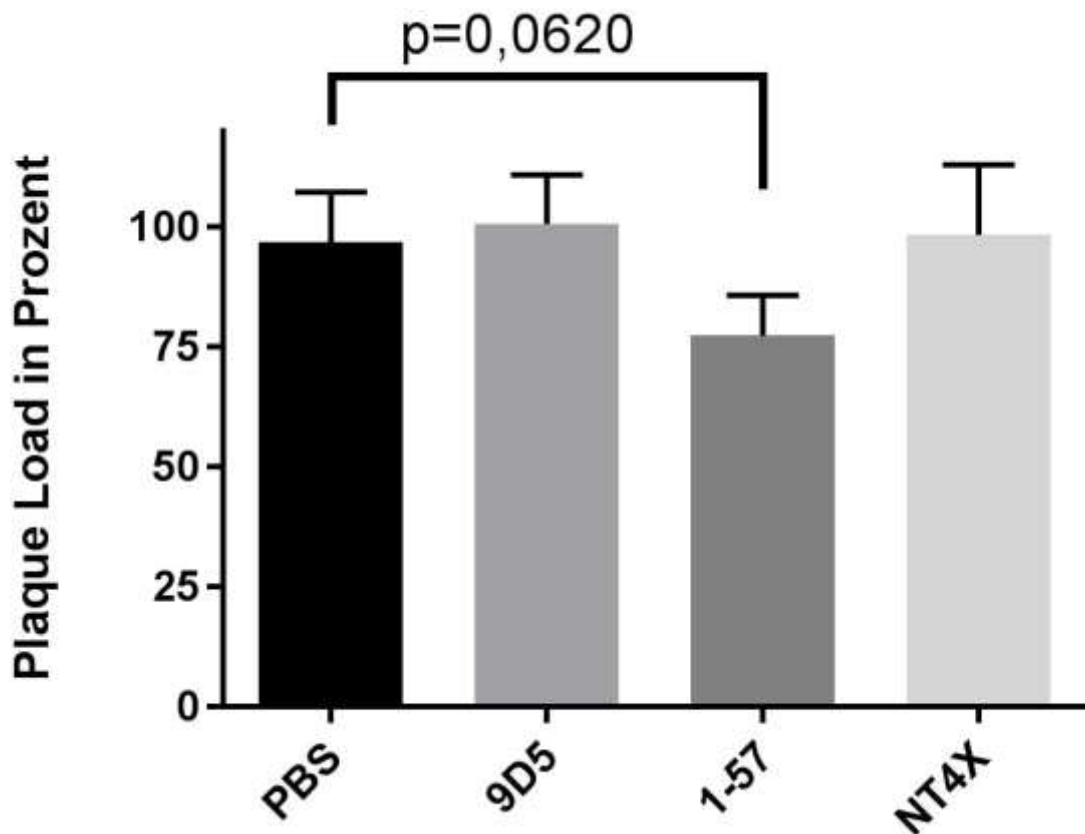


Abbildung 3.13: Ergebnisse der panA β -Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse
Es gibt zwischen den PBS, 9D5 und NT4X immunisierten Tieren keinen Unterschied. 1-57 zeigt jedoch einen sehr starken Trend einer Senkung von 25 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe.
Die Werte für die PBS-Gruppe wurden auf 100% normalisiert, bei n=8 bzw. n=9 pro Gruppe.

Es ist noch zu sagen, dass 1-57 in den Rohdaten zu einer signifikanten Senkung des Plaque Loads führte, diese Signifikanz sich jedoch in der statistischen Aufarbeitung, wie in Absatz 2.2.4.3 beschrieben durchgeführt, verlor.

3.6.2 A β pE3-x-Färbung

Um den Anteil der A β pE3-x-Peptide in den Plaques zu quantifizieren, erfolgte eine DAB-Färbung mit 1-57 als Antikörper. Dieser Pyroglutamat-Antikörper ist identisch mit dem 1-57 der immunisierten Tiere. Sein Bindungsprofil wurde bereits in Abbildung 3.7 dargestellt. Der Plaque Load für A β pE3-xs konnte signifikant durch 1-57 gesenkt werden. NT4X zeigt einen Trend, ebenfalls einen positiven Effekt zu haben (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.15).

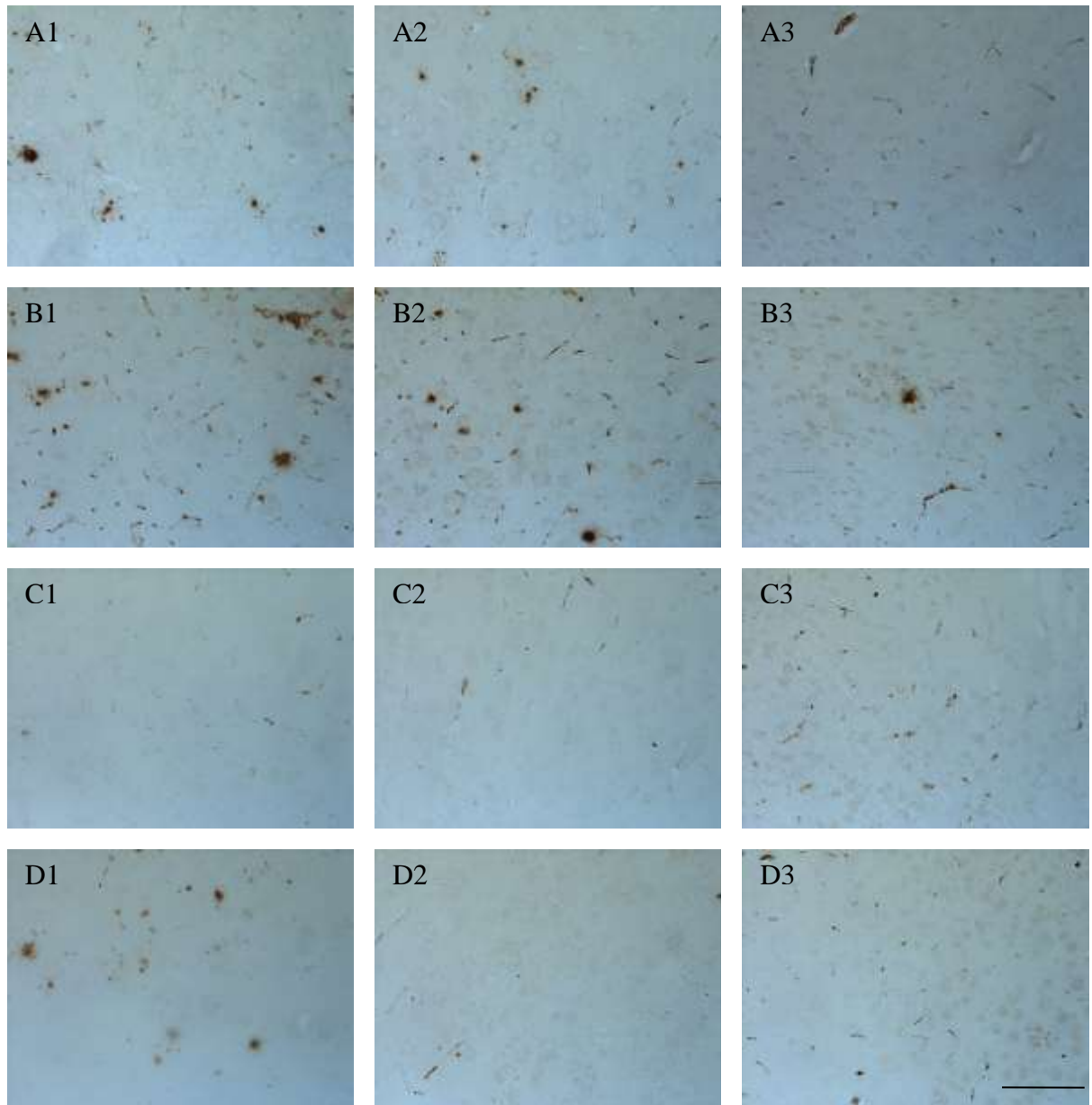


Abbildung 3.14: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in A β E3-x-Färbung
 1 - Somatomotorischer Kortex 2 - Anteriores cinguläres Areal. 3 - retrospleniales Areal (dorsaler Teil)
 (A) = PBS
 (B) = 9D5
 (C) = 1-57
 (D) = NT4X
 Maßstab: 50 μ m
 Antikörper: 1-57 (1:500)

Die Bilder erwecken bereits den Eindruck, dass die Immunisierung *in vivo* den Effekt hatte, den die Western Blots in Abbildung 3.6 und 3.7 *in vitro* anzeigten, nämlich dass die Konzentration von A β E3-x in den mit 1-57 und NT4X immunisierten Tieren reduziert werden konnte. Der ebenfalls für oligomeres A β E3-x spezifische 9D5 Antikörper scheint nicht potent genug zu sein, um den Plaque Load zu beeinflussen.

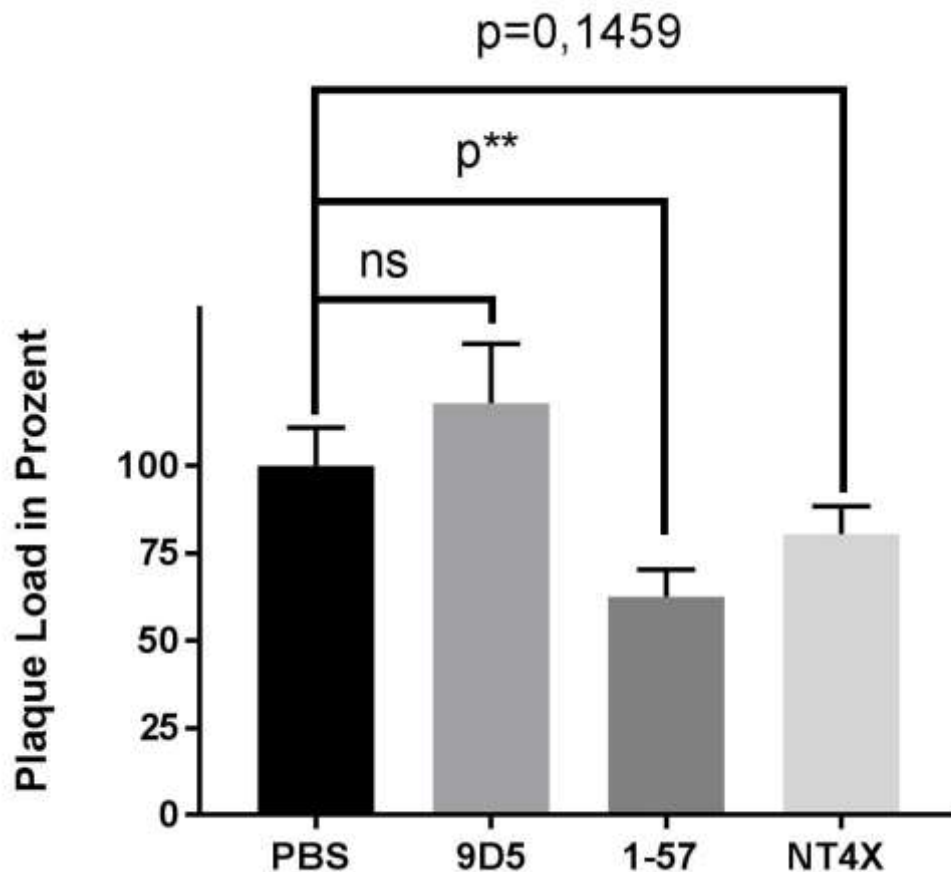


Abbildung 3.15: Ergebnisse der A β E3-x-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse
Wie zu erkennen ist, zeigt 1-57 eine signifikante Reduzierung des Plaque Loads von A β E3-x von etwa 35 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die NT4X Gruppe zeigt einen Trend zur Reduktion.

Die Werte für die PBS-Gruppe wurden auf 100% normalisiert, bei n=8 bzw. n=9 pro Gruppe, p**<0,01.

3.6.3 A β 4-x-Färbung

Um die Konzentration von A β 4-x in den Plaques der Mausgehirne zu überprüfen, wurde der monoklonale Antikörper 029-1, der eigens in der Bayer AG generiert wurde, verwendet. Hierbei fällt auf, dass sich die Morphologie der dargestellten Plaques deutlich von den Pyroglutamat-Plaques (vgl. Abbildung 3.14) und noch deutlicher von dem panA β -Plaques (vgl. Abbildung 3.12) unterscheidet.

NT4X zeigt in dieser Färbung einen hoch signifikanten Effekt, den Plaque Load von A β 4-X um etwa 75% senken zu können. 1-57 hat einen schwächeren positiven Effekt. Zwischen dem Effekt auf den Plaque Load durch NT4X und 1-57 besteht ein signifikanter Unterschied (s. Abbildung 3.16 und 3.17).

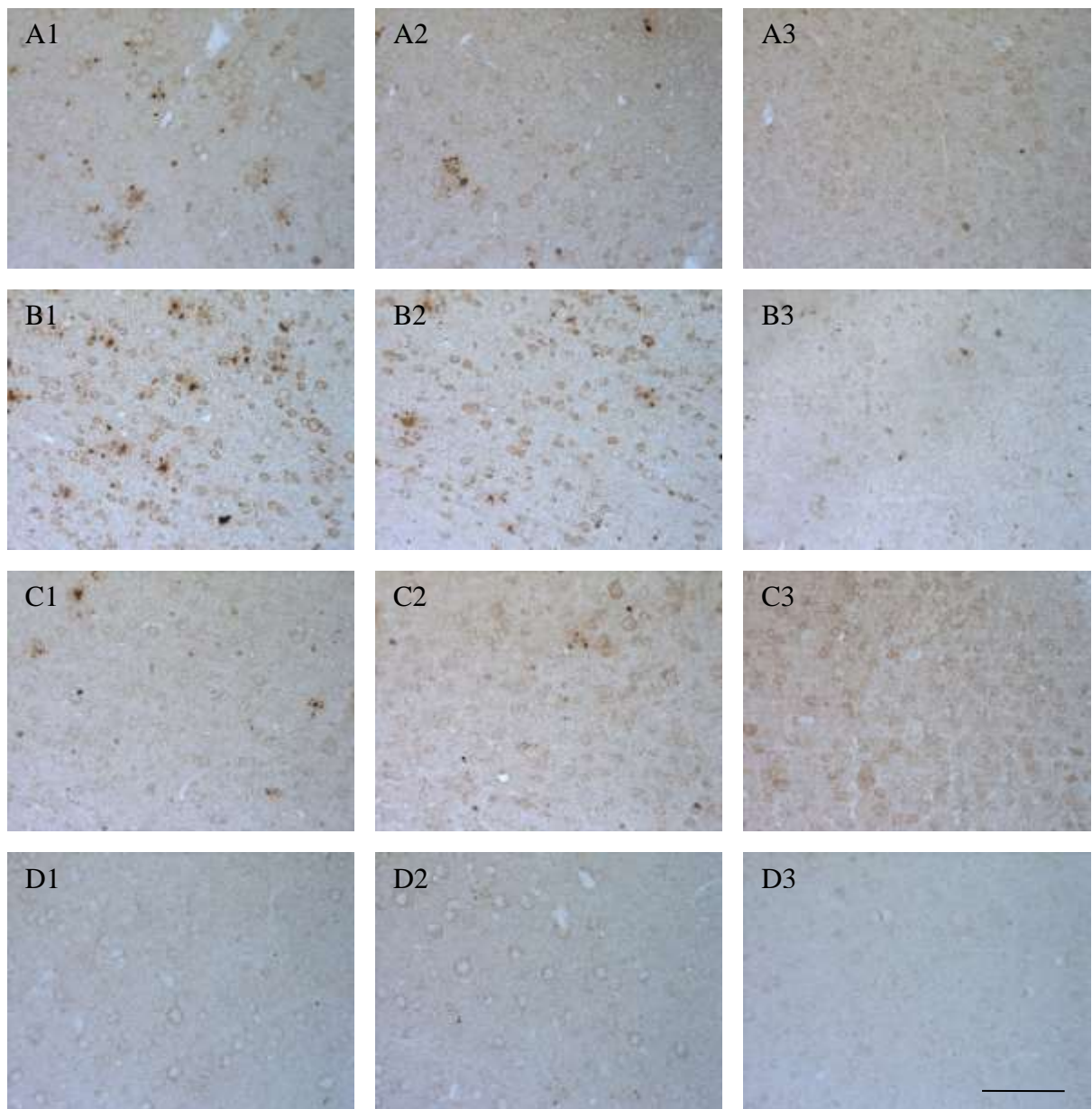


Abbildung 3.16: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in A β 4-x-Färbung
 1 - Somatomotorischer Kortex 2- Anteriores cinguläres Areal. 3- retrospleniales Areal (dorsaler Teil)
 (A) = PBS
 (B) = 9D5
 (C) = 1-57
 (D) = NT4X
 Maßstab: 50 μ m
 Antikörper: 029-1 (1:500)

Die Abbildung 3.16 zeigt sehr deutlich den therapeutischen Effekt des NT4X. Besonders zu den Bildern der PBS und 9D5 Gruppe und in geringerem Maße auch zu den Bildern der 1-57 Gruppe kann man den Unterschied mit bloßem Auge sehen.

Bei kleineren Effekten, wie dem Trend der panA β -Färbung (vgl. Abbildung 3.12 und 3.13), dass 1-57 den Plaque Load leicht senkt, kann man sich anhand der Bilder ohne den Einsatz der Software keines Unterschiedes bewusst werden. Bei dieser Färbung jedoch ist der Unterschied so deutlich, dass man ihn schon bei der Aufnahme der Fotos, ohne Zuhilfenahme der Software, erkennen kann.

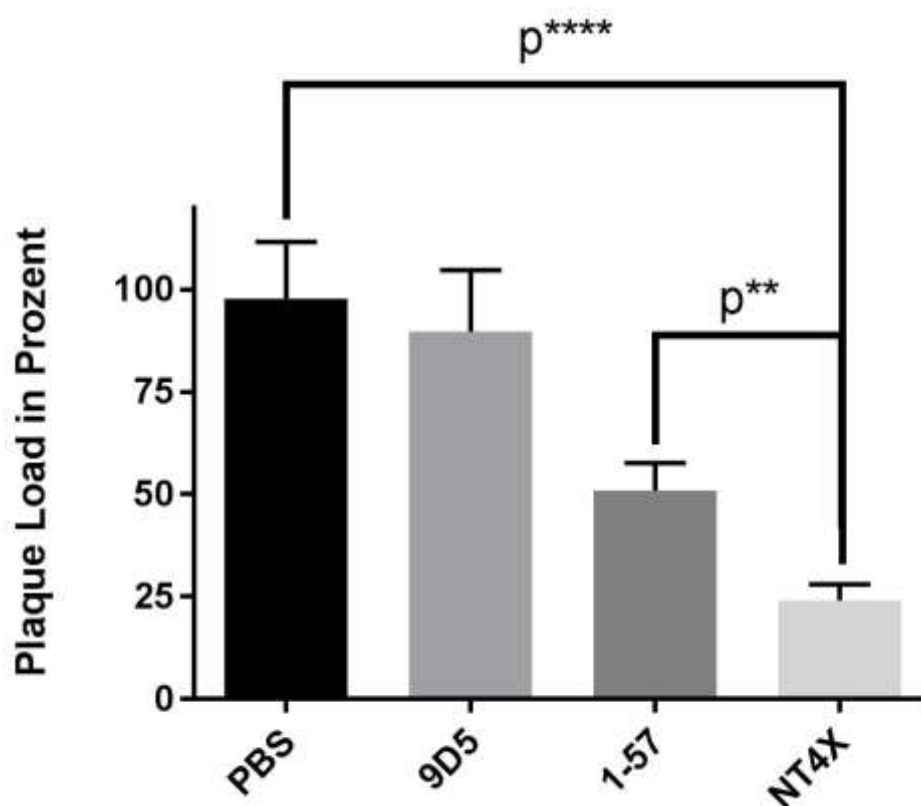


Abbildung 3.17: Ergebnisse der A β 4-x-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse

Wie der Graphik zu entnehmen ist, verringert NT4X den A β 4-x-Plaque Load im höchsten Maße signifikant um etwa 75 %. Im Vergleich zu 1-57 ist ebenfalls eine signifikante Senkung um etwas die Hälfte festzustellen.

Die Werte für die PBS-Gruppe wurden auf 100 % normalisiert, bei n=8 bzw. n=9 pro Gruppe, p**<0,01, p****<0,0001.

Dieses Ergebnis zeigt stärker als andere in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchungen, dass der NT4X-Antikörper in einem präventiven Ansatz im 5XFAD-Mausmodell funktioniert.

3.6.4 A β 1-x-Färbung

Nachdem nun der panA β Plaque Load (Absatz 3.6.1) und der Plaque Load zwei verschiedener N-trunkierter Färbungen (Absatz 3.6.2 und 3.6.3) vorgestellt wurden, soll nun der C-terminal variable A β 1-x-Plaque Load untersucht werden.

Dafür wurde der monoklonale Mausantikörper 80C2 eingesetzt, der sich gegen A β 1-x richtet, also alle A β -Varianten erkennt, die nicht N-trunkiert sind, sondern mit Asparaginsäure an Position 1 beginnen.

1-57 zeigt hier einen signifikanten Effekt, den Plaque Load senken zu können. NT4X zeigt einen Trend, ebenfalls einen positiven Effekt zu besitzen (s. Abbildung 3.18 und 3.19).

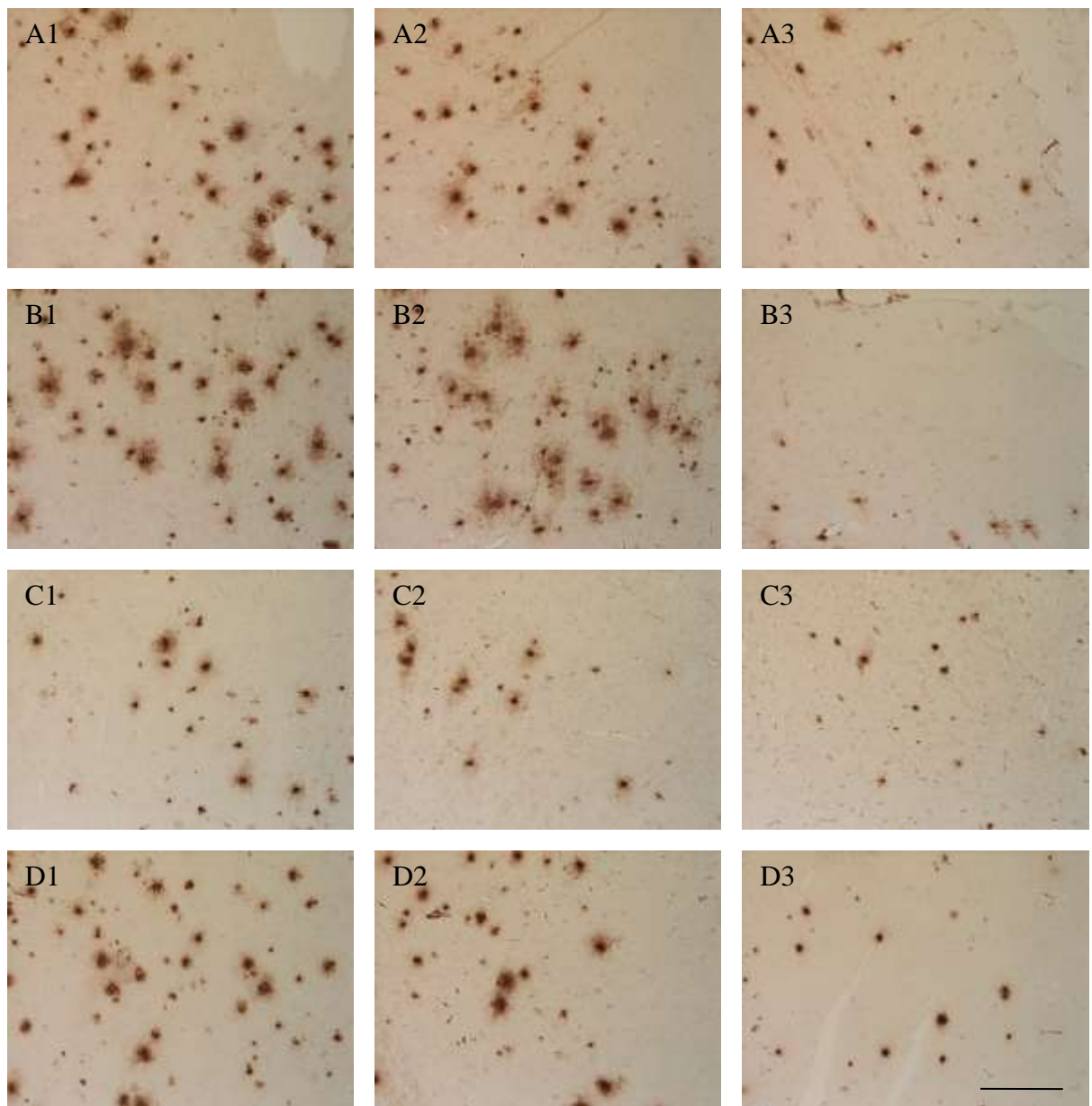


Abbildung 3.18: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse in A β 1-x-Färbung
 1 - Somatomotorischer Kortex 2 - Anteriores cinguläres Areal. 3 - retrospleniales Areal (dorsaler Teil)
 (A) = PBS
 (B) = 9D5
 (C) = 1-57
 (D) = NT4X
 Maßstab: 100 μ m
 Antikörper: 80C2 (1:500)

Wie den Bildern zu entnehmen ist, scheint vor allem 1-57 einen positiven Effekt auf die A β 1-x Konzentration zu haben. Die Morphologie der dargestellten Plaques ist dabei ähnlich der Morphologie der Plaques in der panA β -Färbung. Allerdings sind etwas weniger Ausläufer angefärbt und dafür wird der Kern der Plaques stärker betont.

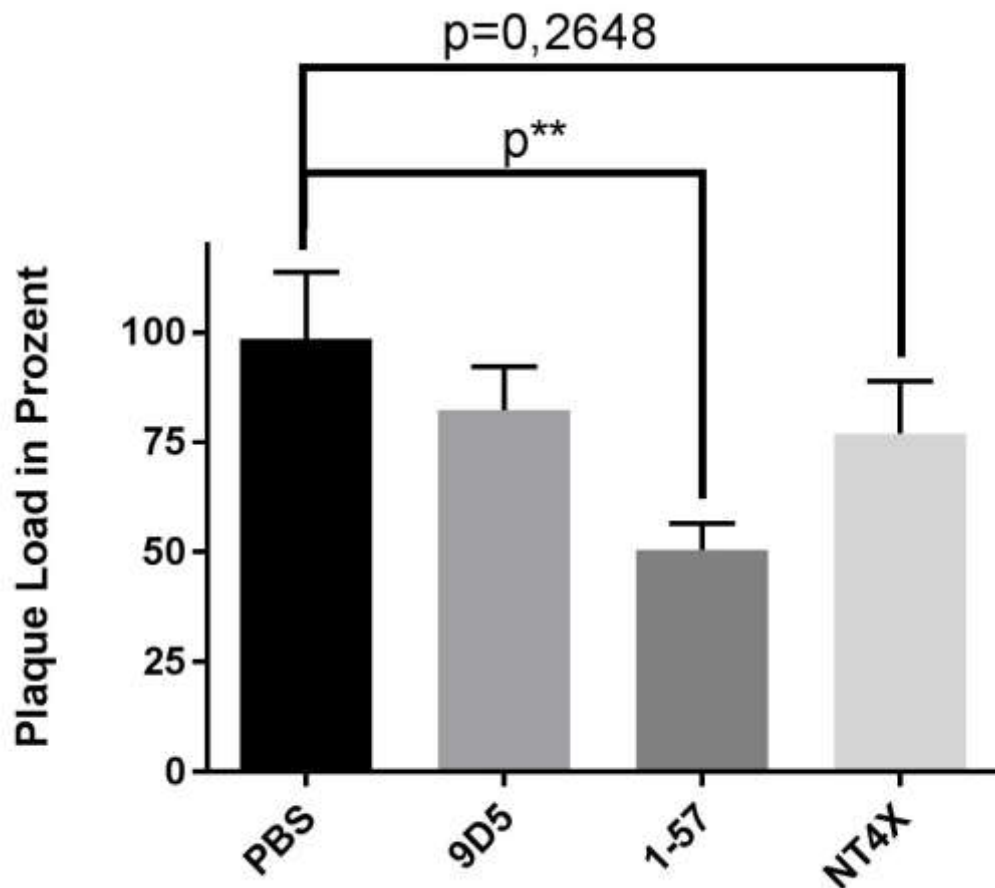


Abbildung 3.19: Ergebnisse der A β 1-x-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse
Nur 1-57 reduziert den A β 1-x-Plaque Load signifikant. Allerdings zeichnet sich anders als bei der panA β -Färbung ein Trend ab, dass NT4X ebenfalls einen positiven Effekt besitzt. Die Werte für die PBS-Gruppe wurden auf 100% normalisiert, bei n=8 bzw. n=9 pro Gruppe, p**<0,01.

Es besteht also ein Trend, dass NT4X neben dem Plaque Load von A β E3-x (Absatz 3.14) auch den Plaque Load von A β 1-x zu verringern vermag.

3.6.5 Thioflavin

Als letzte Färbung soll die in der Klinik zur Plaque-Darstellung verwendete Thioflavin-Färbung gezeigt werden. Diese Färbung stellt lediglich den Plaquekern dar und zeigt nicht die Ausläufer, wie beispielsweise die panA β -Färbung (vgl. Absatz 3.6.1).

Hierbei wurde ein anderes Färbeprotokoll (Absatz 2.2.3.3) angewandt. Die methodische Umsetzung bei der Aufnahme und Auswertung der Fotos unterschied sich insofern, als dass die Bilder in Image J zuerst ins Negativ gekehrt werden mussten, um den passenden Schwellenwert zu ermitteln.

Es zeigt sich, dass sowohl 1-57, als auch NT4X den Plaque Load um etwa 75% reduzieren können (s. Abbildung 3.20 und 3.21).

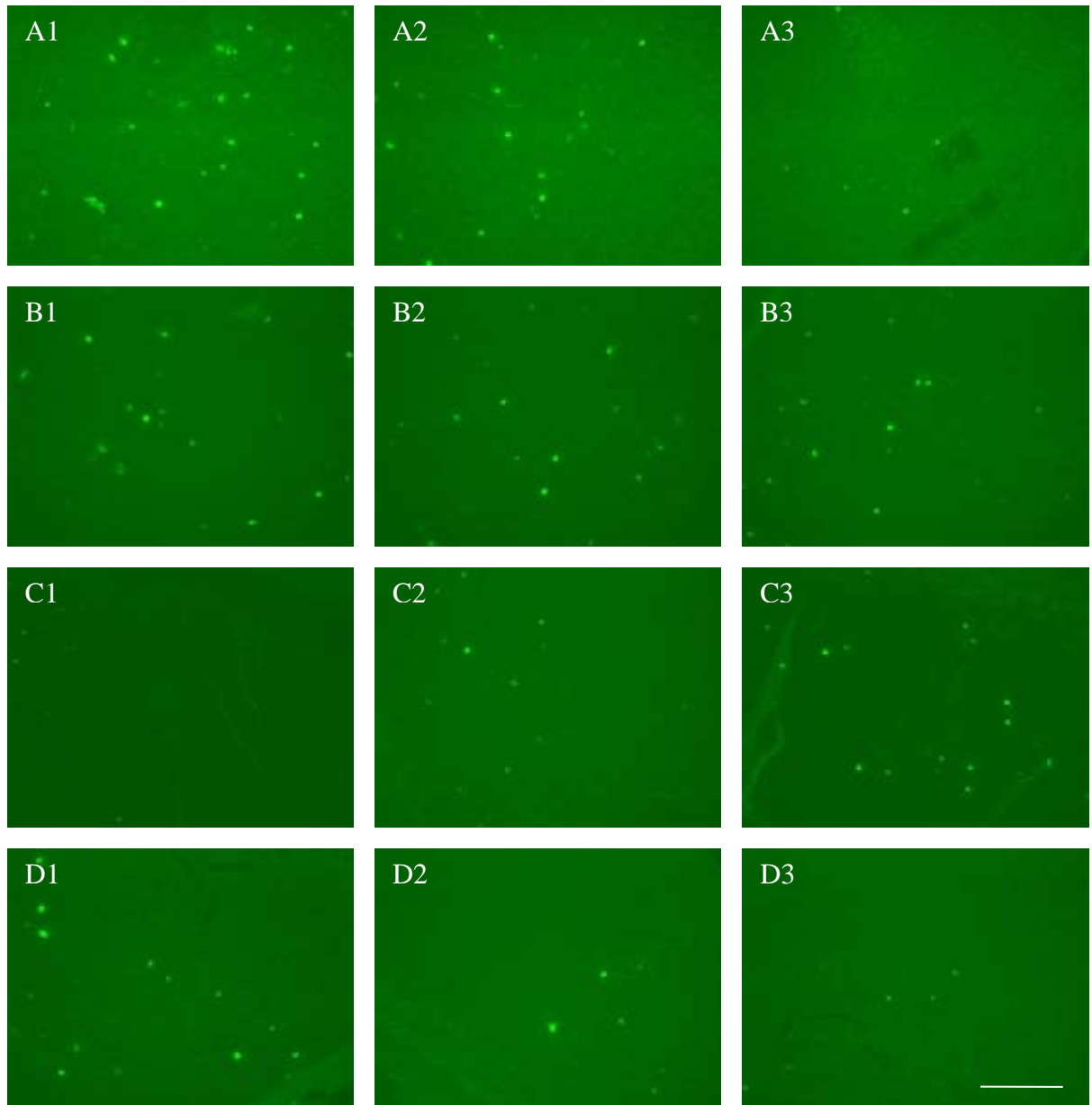


Abbildung 3.20: Beispielbilder der immunisierten 5XFAD-Mäuse mit Thioflavin angefärbt

1 - Somatomotorischer Kortex 2 - Anteriores cinguläres Areal. 3 - retrospleniales Areal (dorsaler Teil)

(A) = PBS

(B) = 9D5

(C) = 1-57

(D) = NT4X

Maßstab: 100 μm

Thioflavin wurde in einer 1% Lösung verwendet.

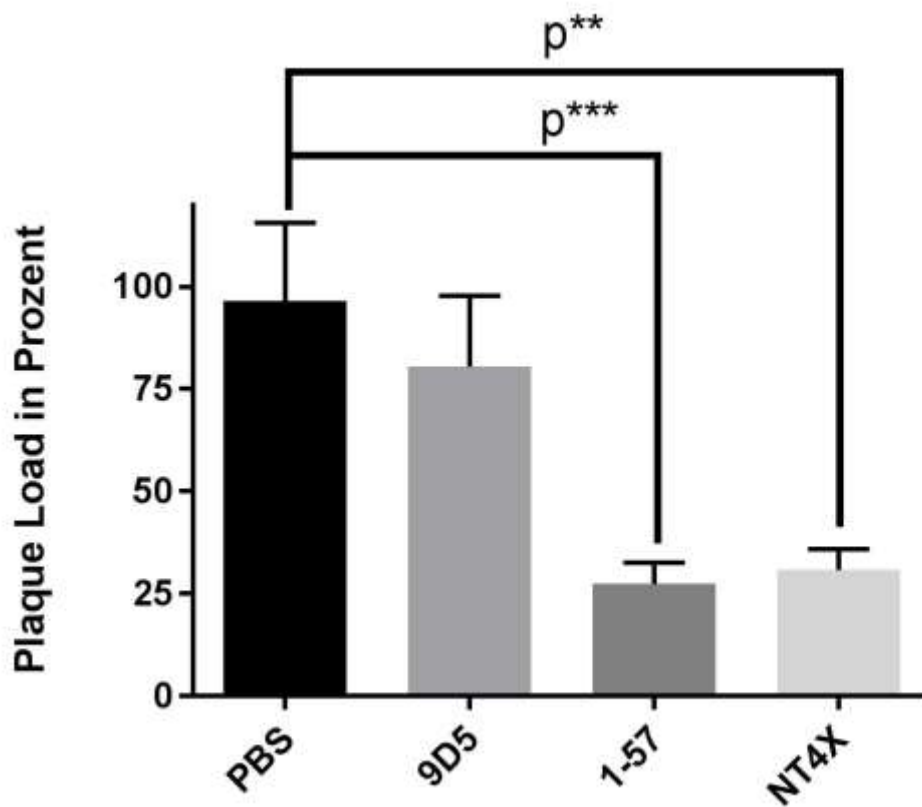


Abbildung 3.21: Ergebnisse der Thioflavin-Färbung der immunisierten 5XFAD-Mäuse
 Wie der Graphik zu entnehmen ist, reduzieren sowohl 1-57 als auch NT4X signifikant den Plaque Load, wenn man gezielt die Kerne der Plaques betrachtet.

Die Werte für die PBS-Gruppe wurden auf 100% normalisiert, bei n=8 bzw. n=9 pro Gruppe, $p^{**}<0,01$, $p^{***}<0,001$.

Wie zu erkennen ist, vermag der NT4X-Antikörper den Plaque Load zu reduzieren, wenn man die Kerne der Plaques betrachtet oder einzelne N-trunkierte A β -Peptide, wie A β pE3-x oder im Besonderen A β 4-x. Auch A β 1-x-Peptide können vermutlich in ihrer Gesamtheit reduziert werden.

Dabei wird jedoch die Gesamtlast des A β nicht angegriffen, wie die panA β -Färbung zeigte.

Es ist noch anzumerken, dass davon abgesehen wurde, die einzelnen Areale innerhalb einer Färbung miteinander zu vergleichen, da dies keinen Wissenszugewinn erbrachte und die Graphen letztendlich so aussahen, wie die hier gezeigten.

4 Diskussion

4.1 NT4X bindet kaum an Plaques im humanen Gewebe

In diesem ersten Versuch sollte das Bindungsverhalten des NT4X anhand von humanem Gewebe von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu dem umfangreich getesteten panA β -Antikörper Solanezumab (BS) untersucht werden.

Zunächst wurde subjektiv bewertet, wie viele Plaques und Gefäße der jeweilige Antikörper anfärben konnte. Im Anschluss wurde - wie in Absatz 2.2.4 beschrieben- eine objektive Plaque-Quantifizierung durchgeführt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass der NT4X Gefäße stärker anfärben konnte als Plaques und insgesamt eine schwächere Bindung als Solanezumab (BS) zeigt. Die Plaque-Quantifizierung unterstrich diesen Eindruck und konnte signifikant zeigen, dass NT4X etwa nur 2 % der Plaques erkennen konnte, die Solanezumab (BS) anfärbte.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten anderer Arbeiten. So konnte mit dem gleichen Verfahren ebenfalls gezeigt werden, dass NT4X in humanem Gewebe zum einen insgesamt weniger Plaques und Gefäße detektiert als Solanezumab (BS) und zum anderen, dass NT4X Gefäße stärker anfärbt als extrazelluläre Amyloid-Plaques (Bouter et al. 2015).

Dass der NT4X stärker an Gefäße bindet, könnte dem Umstand geschuldet sein, dass in den Gefäßen viel A β _{x-40} vorhanden ist (Bouter et al. 2015).

Auf den ersten Blick scheint es, als würde der NT4X mit diesem Ergebnis viel schlechter dastehen als Solanezumab (BS), wenn er nicht in der Lage ist, die Plaques, die er letztendlich verhindern soll, zu erkennen. Allerdings kann dieser Anschein trügerisch sein. Es wurde bereits besprochen, dass die Anzahl an Plaques nicht gut mit dem klinischen Erscheinungsbild der Patienten übereinstimmt und sogar dass A β -Plaques in gesunden Patienten ohne Symptome vorkommen können (Price et al. 2009; Gouras et al. 2015).

Außerdem scheinen die Plaques im Sinne der modifizierten Amyloid-Hypothese (vgl. Absatz 1.5.4) als eine Art Reservoir zu dienen und es die intraneuronalen Level von A β und die löslichen Oligomeren von A β sind, die die toxischen Effekte ausüben und ihrerseits besser mit dem klinischen Bild korrelieren (Näslund et al. 2000; Oakley et al. 2006)

Es könnte insofern sogar ein Vorteil des NT4X darstellen, als er nicht mit solcher Affinität an Plaques in humanem Gewebe bindet, bei deren Zerfall möglicherweise toxische A β -Varianten freigesetzt würden (Jimenez et al. 2014; Benilova et al. 2012).

Es ist anzumerken, dass sowohl Solanezumab(BS) als auch Crenezumab als auch Bapineuzumab ein erhöhtes Bindungsprofil zu Plaques aufweisen als NT4X (Bouter et al. 2015). Obwohl Solanezumab sogar wie NT4X in der Lage ist, N-trunkierte A β -Varianten wie A β pE3-x oder A β 4-x zu erkennen, konnte auch letztendlich dieser, genau wie Bapineuzumab, keine zufriedenstellenden Ergebnisse in den klinischen Studien liefern (Blennow et al. 2012; Honig et al 2018).

Dies unterstreicht womöglich die Wichtigkeit der löslichen Oligomere gegenüber den aggregierten A β -Plaques und somit den Vorteil von NT4X.

4.2 Die Inflammation nimmt im 5XFAD-Modell im Verlauf zu

Die Neuroinflammation stellt, wie in Absatz 1.4.3 beschrieben, eines der charakteristischen, histopathologischen Merkmale der Alzheimer-Erkrankung dar. Die Entzündungsreaktion besteht vor allem aus der Astrogliose, aber auch aus der Mikrogliose, dem Komplementsystem und anderen proinflammatorische Substanzen. Häufig befinden sich die Entzündungsherde dabei in räumlicher Nähe zu den Amyloid-Plaques, was den Schluss nahelegt, dass diese die Entzündungsreaktion mit verursachen und aktiv halten (Akiyama et al. 2000; Oakley et al. 2006).

Insofern sind die Ergebnisse dieser Arbeit auch sehr passend und decken sich mit anderen Experimenten in der Literatur, denn die in dieser Arbeit verwendeten Tiere waren drei bzw. neun Monate alt. Das 5XFAD-Mausmodell exhibiert Amyloid-Plaques, die im Altersverlauf zunehmen, ab etwa zwei Monaten und zeigt mit neun Monaten bereits ausgeprägte Synapsen- und Neuronenverluste.

Der Schluss liegt also nahe, dass die drei Monate alte Gruppe vor allem die Neuroinflammation im Rahmen der Plaque-Pathologie darstellt, während die signifikant gesteigerte Neuroinflammation bei der neun Monate alten Gruppe nicht nur durch die Amyloid-Plaques, sondern auch durch den dazu kommenden Neuronen- und Synapsenverlust bedingt ist.

Dies unterstreicht die Wichtigkeit des Zeitpunkts der therapeutischen Intervention. Wie schon andere Arbeiten weist auch dieses Experiment darauf hin, dass antiinflammatorische Therapieveruche möglichst früh unternommen werden müssen, um die Chance zu haben, erfolgreich zu sein (Hausse-Wegrzyniak et al. 1999; Akiyama et al. 2000).

Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass antiinflammatorische Therapien, beispielsweise im Rahmen der antiarthritischen Therapie, einen protektiven Effekt vor der Alzheimer-Erkrankung besitzen (McGeer et al. 1996), gestaltet sich das Design prospektiver Studien mit antiinflammatorischen Substanzen beim Menschen aus mehreren Gründen als schwierig. Zum einen ist der Zeitraum, über den antiinflammatorische Medikamente verabreicht werden, schwierig zu ermitteln, handelt es sich doch um eine chronische, aber schwache Inflammation, bei der sich erst über Jahre ein klinisch apparenter Schaden entwickelt. Zum anderen ist es schwierig, das passende Medikament und die passende Dosis zu ermitteln (Akiyama et al. 2000).

So konnten NSAR im transgenen Tiermodell sowohl die Neuroinflammation als auch den Plaque Load reduzieren (Lim et al. 2000). Allerdings konnte im 5XFAD-Modell das NSAR Ibuprofen zwar die Neuroinflammation senken, wenn es über drei Monate appliziert wurde, doch der Plaque Load veränderte sich dadurch nicht, sondern es wurde sogar mehr lösliches A β 1-42 nachgewiesen und manche Verhaltensauffälligkeiten wurden sogar schlimmer (Hillman et al. 2012). In einer doppelt verblindeten Placebo-kontrollierten Studie konnte jedoch die kognitive Verschlechterung beim Menschen verlangsamt werden (Rogers et al. 1993). Bei NSAR liegen also kontroverse Ergebnisse vor, ob sie bei Alzheimer hilfreich sein können.

Andere antiinflammatorische Medikamente, wie Glukokortikoide, könnten sogar einen negativen Effekt haben, denn bei Alzheimer-Patienten besteht häufig ein Hypercortisolismus, sodass die Gabe von Steroiden die Situation sogar verschlimmern könnte (Weiner et al. 1997; Akiyama et al. 2000).

Anders als für NSAR, Glukokortikoide oder auch Vitamin E kann die Behandlung mit Ginkgo biloba laut Leitlinie Demenzen erwogen werden (Leitlinie Demenzen 2016). Laut Studien könnten die anti-oxidativen Eigenschaften des Ginkgo Extraktes einen positiven klinischen Effekt haben (Curtis-Prior et al. 1999; Akiyama et al. 2000).

4.3 Die Neurogenese fällt bei 5XFAD-Tieren nach sechs Monaten ab

Die Neurogenese ist allgemein als eine wichtige und notwendige Grundlage zur Aufrechterhaltung von kognitiven Funktionen wie Lernen und Gedächtnis akzeptiert (Wirhns 2017). Im

Mausmodell lässt sich bei C57BL6-Wildtyp-Tieren nachweisen, dass durch körperliche Aktivität, zum Beispiel durch ein Laufrad im Käfig, die Neuronenzahl im Gyrus Dentatus und der CA1-Region gesteigert und auch das Volumen des gesamten Hippocampus erhöht werden kann (Hüttenrauch et al. 2016).

Allerdings konnte in einem ähnlichen Versuch mit transgenen APP/PS1KI-Alzheimer-Mäusen, keinerlei solcher positiven Effekte erzielt werden. Weder die Neuronenzahl, noch der Plaque Load, noch die Neurogenese wurden durch die körperliche Aktivität beeinflusst (Cotel et al. 2012). Da das APP/PS1KI-Mausmodell, ähnlich wie das 5XFAD-Mausmodell, eher ein Modell für ausgeprägten Morbus Alzheimer darstellt, äußern die Autoren die Ansicht, dass körperliche Aktivität eher bei Patienten mit MCI als mit symptomatischem Alzheimer positive Effekte haben könnte (Cotel et al. 2012).

Beim Menschen konnten ebenfalls positive Effekte durch physische Aktivität gezeigt werden (Smith et al. 2014).

Diese Effekte wurden vor allem mit der gesteigerten Ausschüttung von neurotrophen Faktoren, wie dem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), und der erhöhten Angiogenese erklärt (Paillard et al. 2015). Beides führe zu erhöhter Synaptogenese und Neurogenese (Wirths 2017).

Derartig neu entstandene Neurone lassen sich im Gyrus Dentatus des Hippocampus beispielsweise mit Doublecortin anfärben. Da adulte Neuronen sich nicht länger mit Doublecortin anfärben lassen, stellt Doublecortin einen validen Weg dar, spezifisch reifende Neurone zu zeigen. Da es nur wenige Studien mit menschlichem Gewebe gibt, kommt den Mausmodellen besondere Aufmerksamkeit entgegen (Wirths 2017).

In der Literatur wurden bereits viele Alzheimer-Mausmodelle auf die Neurogenese hin untersucht.

So zeigten beispielsweise APP/PS1 Δ Ex9-Mäuse eine eingeschränkte Neurogenese bei neun Monate alten Tieren, jedoch nicht mit fünf Monaten, wo es in diesem Mausmodell noch keine Plaque-Pathologien gibt (Taniuchi et al. 2007). Auch im 3xTg-Mausmodell, welches zwei Mutationen für APP und eine Mutation für Tau besitzt, konnte verringerte Neurogenese schon bei vier Monate alten, weiblichen Tieren dargestellt werden (Rodríguez et al. 2008). Interessanterweise konnten intraneuronale erhöhte A β Level, nicht aber extrazelluläre Plaques gezeigt werden. Man könnte daraus schlussfolgern, dass Plaques nicht alleine für verringerte Neurogenese ausschlaggebend sind.

Diese These wird durch einen Versuch unterstützt, in dem hAPP-I5, ein Mausmodell, welches humanes Wildtyp-APP mit PDGF- β als Promotor exprimiert, mit dem hAPP-J20-

Mausmodell verglichen wurde (Pan et al. 2016). In letzterem werden zwei APP-Mutationen mit vergleichbaren mRNA-Mengen exprimiert, allerdings mit deutlich mehr A β . Nicht nur zeigen hAPP-I5 Mäuse eine geringere Neurogenese als hAPP-J20 Mäuse, sondern selbst wenn durch eine Deletion von Cystatin C in hAPP-J20-Mäusen die Menge an A β deutlich gesenkt wird, hat dies keinen Effekt auf die Neurogenese. Es lässt sich folgern, dass A β in diesem Mausmodell nicht der ausschlaggebende Faktor für eingeschränkte Neurogenese ist (Pan et al. 2016; Wirths, 2017).

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Neurogenese von 5XFAD-Mäusen im longitudinalen Verlauf im Vergleich zu Wildtyptieren untersucht. Es wurden dabei drei, sechs und zwölf Monate alte Tiere untersucht (vgl. Absatz 3.4).

Zunächst fällt auf, dass die Neurogenese auch bei den Wildtyptieren insgesamt im Altersverlauf abnimmt. Dies ist bekannt und stellt den normalen Verlauf bei Nagetieren dar (Kuhn et al. 1996). Allerdings fällt der stark signifikante Abfall von sechs Monate alten und zwölf Monate alten transgenen 5XFAD-Tieren auf.

Obwohl Plaquebildung und beginnender Neuronenverlust schon vor sechs Monaten vorliegt, scheint es der Neurogenese bei sechs Monate alten Tieren keinen Abbruch zu tun. Stattdessen sind diese mit gleichaltrigen Wildtypen auf einem ähnlichen Level.

Das ist insofern interessant, als das 5XFAD-Mausmodell sehr früh intrazellulär A β akkumuliert und auch extrazelluläre Plaque-Pathologien zeigt. Anhand der Daten aus den Studien mit anderen Mausmodellen war daher ein früherer Einbruch der Neurogenese zu erwarten (Wirths 2017).

4.4 NT4X kann den Plaque Load im präventiven Ansatz senken

Im Zuge dieser Arbeit wurden sechs Wochen alte 5XFAD-Mäuse mit NT4X, Kontrollantikörpern und PBS zwölf Wochen lang passiv immunisiert. Es wurde bereits ein therapeutischer Nutzen von NT4X im 5XFAD-Tieren gezeigt. Dabei wurde ebenfalls der Effekt von NT4X auf den Plaque Load im 5XFAD-Mausmodell untersucht, allerdings mit dem großen Unterschied bei dem Zeitpunkt der Intervention. Dort nämlich wurden die Tiere erst, wenn sie fünf Monate alt waren, für einen Zeitraum von zehn Wochen immunisiert. (Antonios et al. 2015)

Im Hinblick auf den normalen Verlauf der Pathologie des 5XFAD-Mausmodells (vgl. Absatz 1.7) handelte es sich also um einen therapeutischen Ansatz, nachdem sich bereits viele

Plaques gebildet haben, Gliose nachweisbar ist und auch schon Synapsen- und Neuronenverlust vorliegen. Dem gegenüber wurde im Rahmen dieser Arbeit ein präventiver Ansatz verfolgt, denn die passive Immunisierung wurde bei 1,5 Monate alten Tieren begonnen und zwölf Wochen durchgeführt, also genau ab dem Zeitpunkt an, wenn intraneuronales A β beginnt, sich abzulagern.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine panA β -Färbung durchgeführt (vgl. Absatz 3.6.1). Nach der statistischen Aufarbeitung konnte keiner der Antikörper einen signifikanten therapeutischen Effekt erreichen. Allerdings zeigt der A β pE3-x spezifische Antikörper 1-57 einen Trend, den panA β -Plaque Load um etwa 25% zu senken, wohingegen NT4X und die IgG-Kontrolle 9D5 keinen Unterschied zu PBS zeigten.

Es muss dabei bedacht werden, dass das 5XFAD-Mausmodell zum größten Teil A β 1-42-Plaques bildet, wohingegen im Menschen die N-trunkierten A β -Varianten zahlenmäßig überlegen sind (Portelius et al. 2010; Antonios et al. 2015).

Wie der Western Blot dieser Arbeit (vgl. Absatz 3.3) und die Western Blots als Referenz aus anderen Arbeiten (Antonios et al. 2013) zeigten, erkennen sowohl 1-57 als auch NT4X A β pE3-x. Allerdings erkennt 1-57 im Gegensatz zu NT4X auch höher molekulare Aggregate von A β pE3-x.

Hieraus könnte man einen Erklärungsversuch ableiten, wieso 1-57 zumindest einen Trend erzielt. A β pE3-x ist in der Lage, die Aggregation von Vollängen-A β 1-42, zu verstärken. Hierbei seien A β pE3-x-Monomere in der Lage die primäre Kernbildung von A β 1-42 zu erhöhen und darüber hinaus könnten A β pE3-x-Fibrillen eine Art Vorlage und katalytischer Untergrund für die sekundäre Kernbildung und Verlängerung der Peptidketten von A β 1-42 (Dammers et al 2017).

Wenn nun A β pE3-x wichtig zur Plaque Bildung von A β 1-42 ist und das 5XFAD-Mausmodell am ehesten diese Form von Amyloid exprimiert, könnte dies erklären, warum ein Antikörper wie 1-57, der spezifisch gegen A β pE3-x gerichtet ist, den gesamt Plaque Load zu verringern vermag.

Nun zeigt auch der NT4X im Western Blot (vgl. Absatz 3.3; Antonios et al. 2015) die Fähigkeit, A β pE3-x zu erkennen, allerdings bindet er nicht an höher molekulare Aggregate, sondern eher an Monomere und Oligomere. Auf den ersten Blick mag dies wie ein Nachteil des Antikörpers scheinen. Man muss jedoch beachten, dass nicht nur das Verhältnis der A β -Varianten in Alzheimer-Patienten und 5XFAD-Mäusen sehr unterschiedlich ist, sondern es auch gar nicht erwünscht ist, dass Antikörper allzu sehr an fibrilläre Strukturen binden, wie

beispielsweise das Scheitern von Bapineuzumab demonstriert (Salloway et al. 2009; Rinne et al. 2010; Bouter et al. 2015).

Dass NT4X nicht nur *in vitro*, nämlich in den Western Blots, sondern auch *in vivo* in der Lage ist, an A β pE3-x zu binden, zeigt die entsprechende Färbung (vgl. Absatz 3.6.2). Es zeichnet sich hier ein Trend zur A β pE3-x Plaque-Reduktion von etwa 25 % ab.

Dieses Ergebnis ist im Vergleich zu den Resultaten von Antonios et al. (2015) schwächer ausgeprägt, wo in dieser Färbung eine signifikante Plaque-Reduktion nachgewiesen werden konnte. Dieser Unterschied könnte durch die Methodik begründet werden. So sind die Fotos in unterschiedlicher Vergrößerungen und unterschiedlichen Orten des Kortexes aufgenommen worden. Außerdem unterscheidet sich die statistische Aufarbeitung der Rohdaten.

Ähnlich ist jedoch die Reduktion des A β pE3-x-Plaque Loads durch den Antikörper 1-57 um etwa 30-35% (Antonios et al. 2015). Allerdings ist in dieser vorliegenden Arbeit eine signifikante Senkung deutlich geworden.

Dies unterstreicht erneut die Plaque Reduktion aus der der panA β -Färbung (vgl. Absatz 3.6.1). Wie im Western Blot nachgewiesen, bindet 1-57 lediglich an A β pE3-x, sodass die Reduktion des Plaque Loads nur darüber erklärt werden kann, was den Ansatz von Dammers et al. (2017) noch wahrscheinlicher macht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen jedoch eher darauf hin, dass das Bindungsverhalten des NT4X an A β pE3-x nicht effektiv genug ist, um das Gesamtlevel an A β zu senken (vgl. Absatz 3.6.1 und 3.6.2; Antonios et al. 2013).

Nun wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls der A β 4-x spezifische Plaque Load untersucht (vgl. 3.6.3). Dies wurde von Antonios et al. (2015) leider nicht durchgeführt. Es handelt sich wohl um die eindrucksstärksten Ergebnisse dieser Arbeit, denn NT4X vermag den Plaque Load von A β 4-x hoch signifikant um etwa 75 % zu senken. Auch zu 1-57, der seinerseits eine Reduktion von etwa 50 % im Vergleich zur PBS-Gruppe erzielte, besteht ein signifikanter Unterschied.

Dies zeigt sehr deutlich, dass der NT4X im 5XFAD-Mausmodell funktioniert und eine therapeutische Option darstellt.

Ähnlich wie bei Menschen exprimieren 5XFAD-Mäuse vor allem intraneuronal sehr früh in der Pathogenese A β 4-x (Gouras et al. 2000; Bayer und Wirths 2014). Auch wenn, es wie bereits erwähnt, große Unterschiede in der mengenmäßigen Ausprägung der verschiedenen

A β -Varianten gibt, so scheint A β 4-x immer früh aufzutauchen. A β 4-x tritt dabei sogar noch früher auf als A β pE3-x.

Für sich genommen sind beide Varianten toxisch und Mäuse, die nur selektiv eines dieser A β -Varianten ausprägen, zeigen verschiedene phänotypische Veränderungen, sowie Nervenzellverluste besonders in der CA1-Region (vgl. Absatz 1.5.6.1 und Absatz 1.5.6.2). Interessanterweise bilden TBA42-Mäuse, die selektiv A β pE3-x exprimieren, nur wenige Plaques und Tg4-42-Mäuse, die selektiv A β 4-42 exprimieren, sogar gar überhaupt keine (Bayer und Wirths 2014). Hieraus lässt sich, eine nötige Interaktion von A β pE3-x und A β 1-42 ableiten (Dammers et al. 2017). Eine ähnliche Interaktion könnte auch zwischen A β 4-x und A β 1-42 bestehen.

Im gleichen Zug muss auch von einer Interaktion zwischen A β pE3-x und A β 4-4x ausgegangen werden. Denn wenn man die Western Blots (Absatz 3.3) betrachtet, so erscheint es wenig überraschend, dass NT4X, der synthetisches A β 4-42 *in vitro* erkennt, dieses Peptid auch *in vivo* bindet und beseitigen kann. Daraus lässt sich ableiten, dass der Antikörper in diesem Tiermodell schafft, was er soll, aber auch 1-57, der im Western Blot nicht in der Lage war A β 4-42, *in vitro* zu erkennen, erreicht eine Reduktion dieses Peptids *in vivo* (vgl Absatz 3.6.3). Wie diese Interaktion aussieht, ist nicht geklärt. Allerdings wurden bereits die Mutmaßungen angestellt, dass A β 4-x ein Untergrund für die Entstehung von A β pE3-x darstellt (Antonios et al. 2015). Möglicherweise funktioniert der Weg jedoch auch andersherum und weniger A β pE3-x, beispielsweise durch einen Antikörper wie 1-57, bedingt weniger A β 4-x. Fest steht jedoch, dass sich beide Peptide biochemisch ähnlich verhalten. So wurde berichtet, dass bei A β 1-42 ein Gleichgewicht von Monomeren und Oligomeren herrscht, die sich schließlich schnell, aber geordnet zu Fibrillen zusammenlagern können, wohingegen sowohl A β pE3-x als auch A β 4-x kein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Oligomeren ausbilden, sondern sich die Waage deutlich in Richtung der Oligomere neigt, die sich schließlich langsam aber ungeordnet als amorphe Fibrillen zusammenlagern (Bayer und Wirths 2014).

Neben den beiden N-trunkierten A β Färbungen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Färbung für A β 1-x, also potentiell C-trunkierte Varianten durchgeführt (vgl. Absatz 3.6.4). Hier zeigt nur 1-57 eine signifikante Plaque-Reduktion, aber anders als bei der panA β -Färbung zeigt der NT4X hier einen Trend zur Reduktion von etwa 25 %. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten für A β 1-x aus anderen Arbeiten, wo ebenfalls eine nicht signifikante Reduktion des Plaque Loads um etwa 20 % beobachtet wurde (Antonios et al. 2015). Man

könnte dieses Ergebnis erneut mit der Hypothese begründen, dass A β pE3-x an der Fibrillenbildung von A β 1-42 beteiligt ist (Dammers et al. 2017).

Ein anderes Ergebnis lieferte jedoch der 1-57 Antikörper. Bei der Intervention bei 5 Monate alten Tieren konnte 1-57 keinerlei Reduktion in der A β 1-x-Färbung bewirken (Antonios et al. 2015), in dem präventiven Ansatz jedoch wurde der Plaque Load signifikant um etwa 50% gesenkt.

In der letzten Färbung wurde das ebenfalls in der Klinik verwendete Thioflavin benutzt, um den Kern der Plaques darzustellen (vgl. Absatz 3.6.5). Hier wurde eine signifikante Senkung des Plaque Loads sowohl durch 1-57 als auch durch NT4X um etwa 75 % erreicht. Antonios et al. (2015) erreichten in ihrer zeitlich späteren Intervention lediglich eine signifikante Reduktion von etwa 40 % für den NT4X und keinerlei Reduktion für den 1-57 Antikörper.

In der Zusammenschau all dieser verschiedenen Färbungen fällt auf, dass sich die vorliegenden Ergebnisse zu dem Versuch von Antonios et al. (2015) deutlich unterscheiden, besonders wenn man auf den 1-57 Antikörper schaut. Abgesehen von dem starken Trend in der panA β -Färbung erreichte er bei den anderen Färbungen signifikante Plaque-Load-Reduktionen, wohingegen er im später beginnenden Versuch keine einzige signifikante Senkung des Plaque Loads erreichte (Antonios et al. 2015). Der Zeitpunkt der Intervention scheint also von enormer Wichtigkeit zu sein.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass 1-57, wenn er älteren 5XFAD-Mäuse appliziert wird, lediglich an bereits bestehende Plaques bindet und somit neutralisiert wird, ohne irgendwelche Veränderungen beizuführen (Bayer und Wirths 2014; Antonios et al. 2015). Im Gegensatz dazu könnte er im Rahmen des präventiven Ansatzes jedoch seine Wirkung durch das Binden an Oligomere und frühe fibrilläre Strukturen erreicht haben, bevor sich zu viele inerte Plaques gebildet haben, die ihn neutralisiert hätten. So ließe sich erklären, warum beispielsweise in der Thioflavin-Färbung für den präventiven Ansatz eine starke signifikante Reduktion erreicht wurde und bei der Intervention nach fünf Monaten keinerlei Effekt erzielt wurde (Antonios et al. 2015).

Diese Vermutung würde dadurch verstärkt werden, dass Antonios et al. (2015) in einer A β x-40-Färbung, also einer Färbung, die jegliche N-trunkierten Varianten darstellt, für 1-57 keine Effekte, für den NT4X jedoch eine signifikante Reduktion von etwa 35% erreichten.

Denn wie die Western Blots (vgl. Absatz 3.3) zeigten, bindet 1-57 auch an höher molekulare Aggregate und NT4X nur an lösliche Oligomere. Dies würde erklären, warum NT4X auch

noch in einem späteren Stadium Effekte auf den Plaque Load erzielen kann, denn anders als 1-57 neutralisiert NT4X sich nicht selbst durch das Binden an bestehende Plaques. Eine andere Hypothese besteht darin, dass sich die Konzentrationen von A β E3-x im Verlauf der Erkrankung verändern. So konnte in dem A β E3-x spezifischen TBA2-Modell gezeigt werden, dass die Menge von A β E3-x bei 4 Wochen alten Tieren ihren Höhepunkt erreicht und danach abnimmt (Alexandru et al. 2011).

Wenn man von etwaigen methodischen und statistischen Unterschieden zwischen den beiden Versuchen absieht, so fällt auf, dass die Plaque-Load-Reduktionen im präventiven Ansatz für 1-57 und NT4X über alle Färbungen hinweg sowohl für die Prozentwerte als auch die Signifikanzniveaus deutlich höher sind. Dies ist wenig überraschend, wenn man bedenkt, dass die 5XFAD-Mäuse ein Modell für eine sehr aggravierte Plaque-Pathologie darstellen (Oakley et al. 2006).

Die Wichtigkeit des Behandlungszeitpunktes konnte bereits in anderen Immunisierungsstudien gezeigt werden. So konnte für die aktive Immunisierung bei Applikation des Impfstoffes in sechs Wochen alten PDAPP-Mäusen gezeigt werden, dass die Bildung von Plaques, neuritischen Dystrophien und Astrogliose verhindert werden kann und in elf Monate alten Mäusen die Progression dieser Erkrankungszeichen nur noch reduziert werden kann (Schenk et al. 1999).

So unterstreicht diese Arbeit erneut, dass jegliche therapeutische Intervention gegen die Alzheimer-Erkrankung, sei es durch physische Aktivität (Smith et al. 2014) oder durch die passive Immunisierung mit Antikörpern eine höhere Chance hat, erfolgreich zu sein, je früher sie angewendet wird.

4.5 Wirkungsmechanismus des NT4X-Antikörpers

Angefangen mit den Untersuchungen von Schenk et al (1999) zur aktiven Immunisierung, konnten viele Arbeiten zeigen, dass Anti-A β Immunisierungstherapien gegen Alzheimer erfolgreich sein können. Dabei ist es gar nicht so eindeutig, wie diese Therapieansätze denn letztendlich funktionieren. Die Frage nach dem Wirkmechanismus wird in der Wissenschaft

kontrovers diskutiert und ist noch nicht vollständig verstanden (Solomon et al. 1997; DeMattos et al. 2001; Bayer und Wirths 2014).

Eine frühe formulierte Hypothese lautete, dass die Antikörper das A β an der Aggregation hindern oder sogar dafür sorgen, dass sich toxische fibrilläre Strukturen wieder in nicht-toxische lösliche Oligomere zurückverwandeln (Solomon et al. 1997). Die Autoren inkubierten dafür Zellkulturen mit einem gegen den N-terminalen (1-28) Teil von A β gerichteten Antikörper und erreichten so eine Auflösung der Amyloid-Fibrillen *in vitro* (Solomon et al. 1997). Es würde sich also um einen direkten katalytischen Effekt handeln (Bayer und Wirths 2014).

Dagegen spricht jedoch, dass das Tg4-42-Mausmodell, welches selektiv A β 4-42 exprimiert, phänotypische Einschränkungen und auch Nervenzellverlust zeigt, aber keine Plaques (Bouter et al. 2013). Durch die passive Immunisierung mit NT4X verloren diese Mäuse signifikant weniger Neuronen und verbesserten sich auch in den Verhaltensexperimenten (Antonios et al. 2015). Die Wirkung der Antikörper kann also nicht darauf beruhen, Amyloid-Ablagerungen wieder in eine lösliche Form zu überführen. Besonders vor dem Hintergrund der modifizierten Amyloid-Hypothese, die besagt, dass die Amyloid-Plaques eher als eine Art eine Reserve dienen, als selbst toxisch zu sein (Wirths et al. 2004).

Eine andere Hypothese besagt, dass die Antikörper A β über Mikroglia vermittelt entfernt können (Wang et al. 2011). Demnach würden aktivierte Mikroglia den Fc-Rezeptor der Antikörper, die an Amyloid-Ablagerungen gebunden haben, erkennen und in Folge die Phagozytose mit Auflösung der Peptide stattfinden (Wang et al. 2011).

Es könnte sich dabei um einen in zwei Phasen stattfindenden Prozess handeln. In einem Experiment, bei dem Tg2576-transgene Mäuse, die APP exprimieren, intrakranielle Injektionen mit einem Anti-A β -Antikörper erhielten, stellte sich heraus, dass 4-24 Stunden nach der Applikation ohne mikrogliale Aktivierung eine Reduktion der diffusen Plaques zu beobachten ist, wohingegen nach 1-3 Tagen nach Applikationen eher die kompakten Plaques, mit mikroglialer Aktivierung einhergehend, abgeräumt werden (Wilcock et al. 2003).

Gegen eine notwendige Beteiligung von Mikroglia und der Fc-Rezeptor-vermittelten Phagozytose sprechen die Ergebnisse eines Folgeexperimentes, bei dem Fc-Rezeptor-Knockout-Mäuse basierend auf dem genetischen Tg2576-Hintergrund gezüchtet wurden. Nach passiver Immunisierung gegen A β 1-42 zeigten diese Knockout-Mäuse die gleiche Plaque-Reduktion, wie die Tg2576-Kontrolltiere, was zeigt, dass die Antikörper vermittelte Reduktion des Plaque Loads ohne den Fc-Rezeptor auskommt (Das et al. 2003).

In einem Versuch mit Tg4-42-Mäusen, in dem diese mit dem Fab-Fragment des NT4X immunisiert wurden, zeigte sich ebenfalls ein geringerer Nervenzellverlust und ein verbessertes Lernverhalten, sodass auch diese positiven Effekte nicht auf dem Fc-Rezeptor zurückzuführen sein können (Antonios et al. 2015).

Eine weitere möglich Art und Weise, wie A β -Antikörper sogar unabhängig von der Blut-Hirn-Schranke ihre Wirkung entfalten können, stellt die *Peripheral Sink* Hypothese dar. PDAPP-transgene Mäuse, die nur im ZNS APP exprimieren, erhielten peripher eine passive Immunisierung mit m266, einem gegen den zentralen Teil von A β gerichteten Antikörper (DeMattos et al. 2001). Es zeigte sich, dass die Konzentration von A β im Plasma um das tausendfache gestiegen war, was mit der Verschiebung des Gleichgewichts von A β zwischen ZNS und Plasma begründet wurde (DeMattos et al. 2001). Darüber hinaus sei der Plaque Load im Gehirn der behandelten Mäuse reduziert, obwohl m266 an keine Amyloid-Ablagerung gebunden habe (DeMattos et al. 2001). In einem anschließenden Experiment wurde gezeigt, dass die Gedächtnisschwächen derart behandelte Mäuse rückgängig gemacht werden können, wobei der Plaque Load sich nicht reduziert habe (Dodart et al. 2002). In der gleichen Arbeit wurden zusätzlich Antikörper/A β – Komplexe sowohl im Plasma als auch im Liquor gefunden, sodass gefolgert wurde, dass die positiven Effekte durch den Abfluss von A β aus dem ZNS in die Peripherie und der dortige Abbau zu begründen sei (Dobart et al. 2002). Diese Hypothese wurde in Frage gestellt, indem Kontrollmäusen A β 1-40 ins Gehirn injiziert wurde (Yamada et al. 2009). Unter normalen Umständen wurde dieses A β innerhalb von etwa 30 Minuten entfernt, doch die zusätzliche Applikation von m266 verlängerte diese Zeit deutlich. Dieser Umstand wurde mit der Bildung von Antikörper/A β – Komplexen im Gehirn begründet (Yamada et al. 2009). Die Autoren postulieren, dass m266 intrazerebral monomeres A β bindet, die Formation von multimerem A β verhindert und somit neutralisiert (Yamada et al. 2009). Weitere Experimente mit peripher zugeführten proteolytischen Substanzen, um gezielt A β im Plasma zu senken, deuten ebenfalls darauf hin, dass die *Peripheral Sink* Hypothese nicht stimmt. So wurde APP23-Mäusen die an dem Abbau von A β beteiligte Metalloprotease Neprilysin intravenös verabreicht, ohne dass dadurch die A β -Konzentration intrazerebral gesenkt wurde (Walker et al. 2013). Im Kontrollexperiment wurde APP23-Mäusen intrakraniell Neprilysin verabreicht mit einer darauffolgenden deutlichen Reduktion des löslichen A β im Gehirn (Walker et al. 20013). Ein ähnliches Ergebnis wurde erzielt, nachdem ein BACE-1-Inhibitor, der A β -Produktion verhindern sollte, Tg2576-Mäusen peripher appliziert wurde (Georgievska et al. 2015).

Letztendlich kann die *peripheral sink*-Hypothese nicht für den positiven Effekt des NT4X als Erklärung herangezogen werden.

Ein sinnvoller Erklärungsansatz scheint das direkte Binden bestimmter Antikörper an lösliche oligomere A β -Spezies und somit die Verhinderung derer direkt synaptotoxischer Effekte zu sein (Klyubin et al. 2005). Intracerebroventrikuläre Injektion von menschlichen A β -Oligomeren in den Hippocampus von Ratten inhibierte die LTP der Tiere. Wenn nun ein Antikörper im Anschluss an die Gabe von A β -Oligomeren injiziert wurde, konnte diese Inhibition von LTP komplett negiert werden (Klyubin et al. 2005).

Darüber hinaus könnten, wie unter Absatz 4.4 diskutiert, N-trunkierte Varianten einen Nährboden zur Aggregation von A β 1-42, bieten. Dies zeigten auch Frost et al. (2012), die APP^{swe}/PS1 Δ E9 tg-Mäuse mit einem A β pE3-x Antikörper passiv immunisierten und eine Reduktion des Plaque Loads im Hippocampus und Cerebellum erzielten, wobei die Amyloidkonzentration mit dem ELISA Verfahren gemessen insgesamt unverändert blieb.

Über diese beiden Wirkmechanismen könnte auch der NT4X wirken. Im Tg4-42-Mausmodell konnte er bereits Verbesserung im Lernverhalten und eine Reduktion des Neuronenverlustes erzielen und im 5XFAD-Mausmodell eine signifikante Reduktion des Plaque Loads verschiedener A β -Varianten, wobei der Zeitpunkt der Intervention von essentieller Wichtigkeit war (Antonios et al. 2013; Antonios et al. 2015).

4.6 Die Bedeutung der Blut-Hirn-Schranke

Wie beschrieben kann die *peripheral sink*-Hypothese nicht ursächlich für die Wirkung des NT4X sein. Die Wirkung findet also im Gehirn statt. Nun ist es möglich, den Antikörper oder auch nur das Fab-Fragment direkt intraventrikulär zu applizieren. Antonios et al. (2015) injizierten beispielsweise A β 4-42 in Wildtypiere, die dadurch Gedächtnisschwächen entwickelten. Dieser Effekt ließ sich durch die intraventrikuläre Injektion von NT4X oder dessen Fab-Fragmentes komplett revidieren.

Der Vorteil dieser Applikationsform der passiven Immunisierung liegt auf der Hand. Konzentrationen des Antikörpers sind leichter zu steuern, doch dafür birgt die intraventrikuläre Applikation deutlich mehr Risiken, dauert länger und ist für den klinischen Alltag ungeeignet. Die intravenöse Applikationsform ist also zu bevorzugen.

Das heißt jedoch, dass der Antikörper, um an seinen Wirkungsort zu gelangen, zunächst die Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren muss.

Die Blut-Hirn-Schranke ist die physiologische Barriere zwischen Blutstrom und dem Gehirn. Anders als in anderen menschlichen Geweben, wie Niere oder Leber ist die Blut-Hirn-schranke durch *tight junctions* der Endothelzellen ausgestattet (Vykhodtseva et al. 2008). Sie stellt eine streng regulierte, selektiv-permeable Grenze für Ionen, Nährstoffe, Elektrolyte, Sauerstoff und Stoffwechselendprodukte dar, um die Homöostase des ZNS zu gewährleisten (Daneman und Prat 2015). Es ist außerdem ihre Aufgabe, Toxine, Pathogene, Entzündungszellen, Verletzungen und Krankheiten vom Gehirn fernzuhalten (Daneman und Prat, 2015). Diese Barrierefunktion umfasst jedoch auch niedermolekulare und hochmolekulare Medikamente, wie beispielsweise Antikörper (Bell und Ehlers 2014).

Von den niedermolekularen Medikamenten hält die BHS etwa 98 % vom Gehirnparenchym fern und von den hochmolekularen Medikamenten, nahezu 100 %, sodass es extrem schwierig ist, Neurotherapeutika an den Ort zu bringen, wo sie wirken sollen (Pardridge 2005).

Viele Arbeiten zeigen jedoch, dass es nicht 100 % der Antikörper sind, die von der BHS abgehalten werden. Bard et al. (2000) beispielsweise sprechen, unabhängig von der Isoform des Antikörpers, von etwa 0,1% der Antikörper, die es schaffen, die BHS zu überwinden. Wenn diese Zahl stimmt, zeugt dies nicht nur von der enormen biologischen Potenz, die diese Antikörper besitzen, sondern zeigt auch, dass dieser kleiner Anteil schon reichen könnte, um erfolgreiche klinische Interventionen zu ermöglichen.

Es wäre selbstverständlich wünschenswert, den Anteil der wirksamen Antikörper im Gewebe zu erhöhen, wozu es zahlreiche Ansätze gibt. So lässt sich die BHS durch arterielle Infusion diverser Substanzen in die Karotis wie beispielsweise hyperosmolarer Lösungen, vasoaktiver Mittel, Lösungsmittel, alkylierender Mittel oder Zytokine reversibel unterbrechen (Vykhodtseva et al. 2008; Pardridge 2005). Allerdings ist dieser Unterbrechung der BHS nicht lokalisiert und sorgt mit dem Einstrom von Albumin und anderer Proteine des Plasmas für einen toxischen Effekt auf die Neurone (Pardridge 2005). Die BHS lässt sich ebenfalls durch Ultraschall aufheben, was zwar die Unterbrechung auf einen Bereich des Gehirns beschränkt, aber sehr aufwendig und für diffuse Erkrankungen wie Alzheimer nicht wünschenswert ist (Vykhodtseva et al. 2008).

Ein anderer Weg, einen höheren Anteil der Neurotherapeutika die BHS überwinden zu lassen, führt über die Steigerung der spezifischen Transporter im Endothel. Für hochmolekulare Substanzen ist hier besonders der rezeptorvermittelte Transport (RMT) von enormer Wichtigkeit. Ein Ansatz ist beispielsweise das Therapeutikum an bestimmte endogene Liganden oder Peptidmimetika zu binden um es so als trojanisches Pferd über die BHS zu bewegen (Pardridge 2005).

Man könnte auch durch Verhinderung des Abbaus der Antikörper im Endosom und Lysosom oder die Inhibition der Ubiquitinierung letztendlich die Verfügbarkeit im ZNS steigern (Ciechanover 2005).

Zusammenfassend stellt die BHS eine große Hürde für die intravenöse Applikation der passiven Immunisierung für Antikörper wie den NT4X dar. Es gelangen etwa nur 0,1% der Antikörper in das Hirnparenchym. Dieser kleine Anteil könnte jedoch bereits ausreichen, einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Auch aus wirtschaftlichen Gründen ist es sinnvoll die Menge an Antikörpern, die am Wirkort ankommen, zu steigern. Dies könnte beispielsweise durch Kopplung an bestimmte Liganden erfolgen.

4.7 NT4X im Vergleich zu anderen Antikörpern

Das Feld der Immunisierungstherapien mit Anti-A β -Antikörpern wird bereits seit den Versuchen von Schenk et al. (1999) mit großer Hoffnung betrachtet. Nachdem, wie unter Absatz 1.8.1 beschrieben, die aktive Immunisierung trotz gewisser positiver Effekte, letztendlich aufgrund von aseptischen Meningoenzephalitiden, nicht weiter verfolgt wurde, rückte die passive Immunisierung in den Vordergrund.

Hier konnten im Tiermodell beachtliche Erfolge erzielt werden (Bard et al. 2000; Bayer und Wirths 2014; Antonios et al. 2015). Einige Antikörper, wie Bapineuzumab, Solanezumab, Crenezumab oder Aducanumab, schafften es durch die präklinische Entwicklung und wurden in verschiedenen klinischen Studien an Patienten erprobt (vgl. Absatz 1.8.2.).

Bis auf Aducanumab, der sich zurzeit in großangelegten Phase-III-Studien befindet (Sevigny et al. 2017), versagten jedoch alle Antikörper in irgendeiner Phase und wurden nun ihrerseits ebenfalls aufgegeben.

Es besteht also die Frage, inwiefern der NT4X potentiell besser ist, als die gescheiterten Anti-A β -Antikörper.

Der erste Antikörper, der es bis in die klinische Phase III schaffte und an mehr als 2000 Patienten mit mildem und moderatem Alzheimer in einer doppelt verblindeten Studie getestet wurde, war Bapineuzumab. Obwohl im 11C-PiB PET geringere Mengen von A β in den Gehirnen der Patienten gezeigt werden konnten und auch im Liquor die Menge von Tau und phosphoryliertem Tau gesenkt werden konnte, profitierten die Patienten klinisch nicht von der Behandlung, sondern entwickelten häufig sogar ein vasogenes Ödem unter der Therapie (Salloway et al. 2014; Bouter et al. 2015). Die kristalline Struktur eines Fab-Fragmentes des

Antikörpers mit einem Peptidkomplex zeigte, dass er A β in einer monomeren, helikalen Konformation am N-Terminus binden konnte (Miles et al. 2013). Weiterhin wurde durch Microscale-Thermophoresis gezeigt dass das Fab-Fragment an lösliches A β 1-40 bindet, woraus abgeleitet wurde, dass der Antikörper lediglich monomeres A β bindet und nicht in der Lage sei, N-trunkierte oder modifizierte A β -Varianten zu erkennen (Miles et al. 2013). Es muss bedacht werden, dass beim Menschen - im Gegensatz zu der Maus - der Großteil der A β -Varianten N-trunkiert sind (Portelius et al. 2010). Ein weiterer Grund könnte sein, dass der Antikörper sich zu stark auf die Plaques konzentriert. Wie beschrieben, haben diese eine Reservoirfunktion inne und könnten unter der Therapie mit Bapineuzumab womöglich aufgelöst werden, wodurch mehrere toxische A β Oligomere freigesetzt würden und so zu einer noch höheren Belastung des ZNS führen könnte (Benilova et al. 2012; Bouter et al. 2015). Hier liegt einer der Vorteile von NT4X. Wie in 4.1 und der Literatur gezeigt, bindet er nur sehr schwach an Plaques, was die Gefahr für Nebenwirkungen wie ein Ödem senken könnte (Bouter et al. 2015). Dafür bindet er sehr effektiv an N-trunkierte Oligomere, die in neuerer Zeit für die toxischen Effekte in der Pathogenese verantwortlich gemacht wurden (Bayer und Wirths 2014).

Ein anderer Erklärungsansatz, der immer wieder bei den gescheiterten Antikörpern auftaucht, ist der gewählte Behandlungszeitpunkt, der möglicherweise zu spät ist. So berichten Villemagne et al. (2013), dass bereits Jahre, möglicherweise Jahrzehnte, vor dem Krankheitsausbruch bereits erhöhte A β -Spiegel im Gehirn festgestellt werden können.

So schien es auch bei Solanezumab einen Behandlungserfolg bei Patienten in frühen Stadien zu geben, der sich jedoch nicht reproduzieren ließ, sodass die Forschung mit diesem Antikörper terminiert wurde (Bouter et al. 2015; Siemens et al. 2016; Honig et al. 2018).

Neben der Forschung an Antikörpern und anderen therapeutischen Mitteln wird also auch die Suche nach probaten Mitteln zur Früherkennung wichtig werden. So könnten das FDG-PET und das PIB-PET als prognostische Bilderkennung eine Rolle spielen, oder auch biochemische Analysen aus Blut und Liquor könnten ihren Teil dazu beitragen (Bateman et al. 2012).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Wichtigkeit des Zeitpunkts der Intervention. Wo Antonios et al. (2015) nur moderate Senkungen des Plaque Loads mit NT4X und noch geringere mit dem A β pE3-x-spezifischen Antikörper 1-57 darstellen konnten, schaffte es der präventive Ansatz, bei den jüngeren 5XFAD-Tieren signifikantere und höhere Reduktionen zu erreichen. Der NT4X bietet mit seinem Bindungsprofil an lösliche Oli-

gomere möglicherweise einen Vorteil gegenüber zentralen A β -Antikörpern wie Solanezumab oder Crenezumab, aber auch er kann keine abgestorbenen Nervenzellen wiederbeleben, sodass die Früherkennung der Krankheit eine wichtige Rolle spielt. Dass der Weg über Oligomere der richtige sein könnte, deutet Aducanumab an, der in den bisherigen Studien sowohl klinisch als auch bildmorphologisch überzeugen konnte (Selkoe und Hardy 2016; Sevigny et al. 2017).

Letztendlich lässt sich sagen, dass der NT4X im Tiermodell, sowohl was histopathologische Merkmale wie den Plaque Load im 5XFAD-Tieren (vgl. Absatz 3.6) als auch was Gedächtnisschwächen in Tg4-42-Tieren angeht (Antonios et al. 2015), ein effektives Therapeutikum darstellt. Da A β 4-x in Alzheimer-Patienten die häufigste Isoform darstellt und weil lösliche Oligomere ein aussichtsreiches Ziel zur Intervention darstellen, scheint die Erprobung am Menschen ein vielversprechender Schritt zu sein.

5 Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurde in einem präventiven Behandlungsansatz die therapeutische Kraft des NT4X-Antikörpers in einem Mausmodell für familiären Alzheimer überprüft. Dieses Mausmodell zeigt eine charakteristische pathologische Entwicklung, die durch den Nachweis von Inflammation und eine eingeschränkte Neurogenese im Altersverlauf im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren weiter herausgestellt wurde.

Im Gegensatz zu bekannten A β -Antikörpern wie Solanezumab (BS) zeigt NT4X in seinem Bindungsverhalten nur eine äußerst geringe Affinität zu Plaques im menschlichen Gewebe, sondern bindet eher an lösliche Oligomere.

In den Western Blots wurde *in vitro* ein Bindungsprofil des NT4X erstellt, welches die N-trunkierten Peptide A β pE3-42, A β 4-42 und A β 4-40 sowie im geringeren Maße auch Voll-längen-A β 1-42 umfasste.

In den Experimenten zum Plaque Load zeigte sich ein Trend zur Senkung von A β pE3-x und A β 1-x sowie hoch signifikante Senkungen von A β 4-x und den Kern der Plaques, dargestellt durch Thioflavin. Der Kontrollantikörper 1-57, der A β pE3-x-spezifisch ist, aber im Gegensatz zu NT4X auch an höher molekulare Aggregate bindet, zeigte seinerseits einen Trend zur Senkung des panA β -Plaque Loads und signifikante Senkungen in den anderen Färbungen, was die Wichtigkeit von A β pE3-x als Keimzentrum für die Generierung von Plaques nahelegt.

Vor dem Hintergrund, dass bei Patienten die Verteilung der verschiedenen A β -Varianten zugunsten der N-trunkierten Spezies ausfällt, wobei A β 4-x sogar die häufigste Isoform ist, lässt sich ableiten, dass NT4X ein vielversprechender Therapieansatz ist. Die Tatsache, dass sich die Amyloid-Hypothese gewandelt hat und die Plaques eher als Reservoir für toxische lösliche Oligomere angesehen werden und nicht länger selbst als direkt krankheitsverursachend beurteilt werden, untermauert die Annahme, dass N-trunkierte A β -Varianten ein gutes therapeutisches Ziel darstellen.

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine Hürde für alle Neurotherapeutika dar. Allerdings könnte der sehr geringe Anteil an Antikörpern, die dennoch ins ZNS gelangen, ausreichen, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Es gibt verschiedene Ideen, wie dieser Anteil erhöht werden könnte.

Die Reduktionen des Plaque Loads waren in diesem präventiven Behandlungsansatz bei 1,5 Monate alten Tieren für NT4X und 1-57 signifikant höher als in einer therapeutischen Intervention bei 5 Monate alten Tieren, was die Wichtigkeit des Behandlungszeitpunktes herausstellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der NT4X im Tiermodell erfreuliche Ergebnisse zeigt und mit dem Binden an oligomere N-trunkierte A β -Varianten einen vielversprechenden Ansatz bietet und es sich zeigen muss, ob er letztendlich in klinischen Studien beim Menschen ebenso effektiv sein kann.

6 Ausblick

Zum einen ist nicht nur die Art und Beschaffenheit des Antikörpers in der passiven Immunisierung von entscheidender Bedeutung, sondern auch der Behandlungszeitpunkt. Dieser sollte idealerweise lange vor dem Ausbruch erster Symptome liegen, was die Bedeutung der Früherkennung unterstreicht. Wenn der MMST auffällig wird, besteht womöglich schon

Jahrzehnte lang eine erhöhte Amyloid-Konzentration im Gehirn der Patienten. Daher könnten Screening-Methoden, wie biochemische Analysen aus Blut und Liquor, oder bildgebende Verfahren, wie das PET, an Wichtigkeit gewinnen.

Außerdem ist der NT4X in dieser Form ein Maus-Antikörper, der aus der Maus gewonnen wird und für die Maus bestimmt ist. Bevor er am Menschen erprobt werden kann, muss also eine rekombinante, humanisierte Form des Antikörpers hergestellt werden, die möglicherweise abweichende biologische Eigenschaften hat. Diese gilt es dann ebenso zu testen, bevor der Eintritt aus der präklinischen Forschung in die klinische Forschung gemacht werden kann.

7 Literaturverzeichnis

Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonello K, Lohmann S, Piorkowska K, Gafner V, Atwal JK et al. (2012): An effector-reduced anti-beta-amyloid (Abeta) antibody with unique abeta binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of Abeta. *J Neurosci* 32, 9677–9689

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM et al. (2000): Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383–421

Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC et al. (2011): The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease. Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 270–279

Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Becker A, Bäuscher C, Kohlmann S, Sedlmeier R, Raber KA, Cynis H, Rönicke R et al. (2011): Selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice expressing small amounts of truncated A β is induced by pyroglutamate-A β formation. *Neurosci* 31, 12790–12801

Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr* 64, 146–148

Alzheimer's Association: Alzheimer's disease facts and figures (2010). *Alzheimers Dement* 6, 158–194

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2009. O.Verl., o. O., o. J. [<https://www.alz.co.uk/research/world-report-2009>] (abgerufen am 07.07.2018)

Alzheimer Europe, Luxembourg 2013. EuroCoDe. Prevalence of dementia in Europe. [www.alzheimer-europe.org/EN/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe] (abgerufen am 07.07.2018)

Anand P, Singh B (2013): A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 36, 375–399

Anliker B, Müller U (2006): The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3, 239–246

Antonios G, Saiepour N, Bouter Y, Richard BC, Paetau A, Verkkoniemi-Ahola A, Lannfelt L, Ingelsson M, Kovacs GG, Pillot T et al. (2013): N-truncated Abeta starting with position four: early intraneuronal accumulation and rescue of toxicity using NT4X-167, a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol Commun* 1, 56 doi: 10.1186/2051-5960-1-56

Antonios G, Borgers H, Richard BC, Brauß A, Meißner J, Weggen S, Pena V, Pillot T, Davies SL, Bakrania P et al. (2015): Alzheimer therapy with an antibody against N-terminal Abeta 4-X and pyroglutamate Abeta 3-X. *Sci Rep* 5, 17338 doi: 10.1038/srep17338.

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

Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K et al. (2000): Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916–919

Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM et al. (2012): Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *New Engl J Med* 367, 795–804

Bayer TA, Wirths O (2014): Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 127, 787–801

Bell RD, Ehlers MD (2014): Breaching the Blood-Brain Barrier for Drug Delivery. *Neuron* 81, 1–3

Benilova I, Karran E, Strooper B (2012): The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease. An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15, 349–357

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S et al. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729–733

Blaettler T, Smith J, Smith J, Paul R, Asnaghi V, Fuji R, Quartino A, Honigberg L, Rabbia MA Jr., Yule S, Ostrowitzki S (2016): Clinical trial design of CREAD: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group Phase-3 study to evaluate crenezumab treatment in patients with prodromal-to-mild Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 127, 609
doi: 10.1016/j.jalz.2016.06.1207

Blennow K, Zetterberg H (2009): Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *J Alz Dis* 18, 413–417

Blennow K, Zetterberg H, Rinne JO, Salloway S, Wei J, Black R et al. (2012): Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarker levels in patients with mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol Psy* 69, 1002–1010

Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M et al. (2013): N-truncated amyloid β (A β) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol* 126, 189–205

Bouter Y, Lopez Noguerola JS, Tucholla P, Crespi GAN, Parker MW, Wiltfang J, Miles LA, Bayer TA et al. (2015): A β targets of the biosimilar antibodies of Bapineuzumab, Cren ezumab, Solanezumab in comparison to an antibody against Ntruncated A β in sporadic Alzheimer disease cases and mouse models. *Acta Neuropathol* 130, 713–729

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

Brookmeyer R, Gray S, Kawas C (1998): Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset. *Am J Public Health* 88, 1337–1342

Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003): Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467, 1–10

Cacace R, Slegers K, van Broeckhoven C (2016): Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733–748

Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993): Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259, 514–516

Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F et al. (1999): Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease. Prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Human Genet* 65, 664–670

Castellani RJ, Lee H, Zhu X, Perry G, Smith MA (2008): Alzheimer's disease pathology as a host response. *J Neuropath Exp Neur* 67, 523–531

Check E (2002): Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug. *Nature* 415, 462 doi: 10.1038/415462a

Ciechanover A (2005): Proteolysis. From the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79-87

Cirrito JR, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW et al. (2003): In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci* 23, 8844–8853

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW et al. (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC et al. (1994): Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7, 180–184

Cotel MC, Jawhar S, Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O (2012): Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiol Aging* 33, 96–107

Curtis-Prior P, Vere D, Fray P (1999): Therapeutic value of Ginkgo biloba in reducing symptoms of decline in mental function. *J Pharm Pharmacol* 51, 535–541

Dammers C, Schwarten M, Buell AK, Willbold D (2017): Pyroglutamate-modified A β (3-42) affects aggregation kinetics of A β (1-42) by accelerating primary and secondary pathways. *Chem Sci* 8, 4996–5004

Daneman R, Prat A (2015): The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, doi: 10.1101/cshperspect.a020412.

Das P, Howard V, Loosbrock N, Dickson D, Murphy MP, Golde TE (2003): Amyloid-beta immunization effectively reduces amyloid deposition in FcRgamma $^{-/-}$ knock-out mice. *J Neurosci* 23, 8532–8538

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001): Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 8850–8855

Devi L, Ohno M (2010): Genetic reductions of BACE1 and amyloid- β ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer model mice. *Eur J Neurosci* 31, 110–118

Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM et al. (2002): Immunization reverses memory deficits without reducing brain A beta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5, 452–457

Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I (2000): Smoking and dementia in male British doctors. Prospective study. *BMJ* 320, 1097–1102

Dong J, Atwood CS, Anderson VE, Siedlak SL, Smith MA, Perry G, Carey PR (2003): Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores. Raman microscopic evidence. *Biochemistry-US* 42, 2768–2773

Eimer WA, Vassar R (2013): Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener* 8, 2 <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-2>

Faure A, Verret L, Bozon B, Tayara NETE, Ly M, Kober F, Dhenain M, Rampon C, Delatour B (2011): Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32, 407–418

Ferreira ST, Klein WL (2011): The Abeta oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 96, 529–543

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

Förstl H, Kurz A (1999): Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249, 288–290

Frankó E, Joly O (2013): Evaluating Alzheimer's Disease Progression Using Rate of Regional Hippocampal Atrophy. *Plos One* 8, doi: 10.1371/journal.pone.0071354

Frisoni GB, Fox NC, Jack CRJR; Scheltens P, Thompson PM (2010): The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 67–77

Frost JL, Liu B, Kleinschmidt M, Schilling S, Demuth HU, Lemere CA (2012): Passive immunization against pyroglutamate-3 amyloid-beta reduces plaque burden in Alzheimer-like transgenic mice. A pilot study. *Neurodegener Dis* 10, 265–270

Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP (1996): Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67, 1882–1896

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL et al. (2006): Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *Arch Gen Psychiat* 63, 168–174

Georgievska B, Gustavsson S, Lundkvist J, Neelissen J, Eketjall S, Ramberg V et al. (2015): Revisiting the peripheral sink hypothesis. Inhibiting BACE1 activity in the periphery does not alter beta-amyloid levels in the CNS. *J Neurochem* 132, 477–486

Goate GA, 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

Gomez Gallego M, Gomez Garcia J (2017): Music therapy and Alzheimer's disease. Cognitive, psychological and behavioural effects. *Neurologia* 32, 300–308

Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DWJR, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996): Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16, 4491–4500

Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H et al. (2000): Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156, 15–20

Gouras GK, Olsson TT, Hansson O (2015): β -amyloid Peptides and Amyloid-Plaques in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 12, 3–11

Gustafson DR, Backman K, Waern M, Ostling S, Guo X, Zandi P, Mielke MM, Bengtsson C, Skoog I (2009): Adiposity indicators and dementia over 32 years in Sweden. *Neurology* 73, 1559–1566

Haass C, Strooper, B (1999): The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key. *Science* 286, 916–919

Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994): Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269, 17741–17748

Hall KS, Gao S, Unverzagt FW, Hendrie HC (2000): Low education and childhood rural residence. Risk for Alzheimer's disease in African Americans. *Neurology* 54, 95–99

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L, Blennow K (2007): Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn* 23, 316–320

Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383–388

Harvey R, Skelton-Robinson M, Rossor M (2003): The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psy* 74, 1206–1209

Haus-Wegrzyniak B, Willard LB, Del Soldato P, Pepeu G, Wenk GL (1999): Peripheral administration of novel anti-inflammatories can attenuate the effects of chronic inflammation within the CNS. *Brain Res* 815, 36–43

Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Müller U (2004): Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23, 4106–4115

Hillmann A, Hahn S, Schilling S, Hoffmann T, Demuth HU, Bulic B, Schneider-Axmann T, Bayer TA, Weggen S, Wirths O (2012): No improvement after chronic ibuprofen treatment in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 833.e39-50

Honig LS, Vellas B, Woodward M, Boada M, Bullock R, Borrie M, Hager K, Andreasen N, Scarpini E, Liu-Seifert H et al. (2018): Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 378, 321–330

Hull M, Voigt-Radloff S (2008): Nichtpharmakologische Behandlungsmethoden bei Demenzen. *Nervenarzt* 79, 159-64

Hüttenrauch M, Salinas G, Wirths O (2016): Effects of Long-Term Environmental Enrichment on Anxiety, Memory, Hippocampal Plasticity and Overall Brain Gene Expression in C57BL6 Mice. *Front Mol Neurosci* 9, 62 doi: 10.3389/fnmol.2016.00062

Imbimbo BP, Ottonello S, Frisardi V, Solfrizzi V, Greco A, Seripa D, Pilotto A, Panza F (2012): Solanezumab for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Expert Rev Clin Immu* 8, 135–149

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I (2010): Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 7, 656–664

Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989): Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24, 173–182

Jack CRJR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011): Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 257–262

Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2012): Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 196.e29-40

Jimenez S, Navarro V, Moyano J, Sanchez-Mico M, Torres M, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2014): Disruption of Amyloid-Plaques Integrity Affects the Soluble Oligomers Content from Alzheimer Disease Brains. *Plos One* 9, doi: 10.1371/journal.pone.0114041

Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J et al. (2012): A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99

Kidd M (1963): Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192–193

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

Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (2001): Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment. A population-based study. *Neurology* 56, 1683–1689

Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ et al. (2005): Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med* 11, 556–561

Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS (1997): Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* 18, 661–669

Kontsekova E, Zilka N, Kovacech B, Novak P, Novak M (2014): First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimers Res Ther* 6, 44 doi: 10.1186/alzrt278

Koponen S, Taiminen T, Kairisto V, Portin R, Isoniemi H, Hinkka S, Tenovuo O (2004): APOE-epsilon4 predicts dementia but not other psychiatric disorders after traumatic brain injury. *Neurology* 63, 749–750

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027–2033

Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW. et al. (2010): ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29, 3020–3032

Kumar S, Walter J (2011): Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides – A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging* 3, 803–812

Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O'Brien PC, Palumbo PJ (1997): The risk of dementia among persons with diabetes mellitus. A population-based cohort study. *Ann NY Acad Sci* 826, 422–427

Leitlinie Demenzen 2016: Hrsg. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) und Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN), Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 07.07.2018)

Leung KK, Bartlett JW, Barnes J, Manning EN, Ourselin S, Fox NC (2013): Zerebral atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Rates and acceleration. *Neurology* 80, 648–654

Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B (1990): Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary zerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248, 1124–1126

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

Lewis H, Beher D, Cookson N, Oakley A, Piggott M, Morris CM, Jaros E, Perry R, Ince P, Kenny RA et al. (2006): Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia.

Age-related accumulation of amyloid-beta(42) peptide in vascular dementia. *Neuropath Appl Neuro* 32, 103–118

Lim GP, Yang F, Chu T, Chen P, Beech W, Teter B, Tran T, Ubeda O, Ashe KH, Frautschy SA et al. (2000). Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 20, 5709–5714

López-Toledano MA, Shelanski ML (2004): Neurogenic Effect of β -Amyloid Peptide in the Development of Neural Stem Cells. *J Neurosci* 24, 5439–5444

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985): Amyloid-Plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *P Natl Acad Sci USA* 82, 4245–4249

Mayeux R, Stern Y (2012): Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspect Med* 2, doi: 10.1101/cshperspect.a006239

McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG (1996): Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease. A review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 47, 425–432

McKhann GM, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944

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

Merlos-Suarez A, Ruiz-Paz S, Baselga J, Arribas J (2001): Metalloprotease-dependent pro-transforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *J Biol Chem* 276, 48510–48517

Miles LA, Crespi GAN, Doughty L, Parker MW (2013): Bapineuzumab captures the N-terminus of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide in a helical conformation. *Sci Rep-UK* 3, 1302 doi: 10.1038/srep01302

Minter MR, Taylor JM, Crack PJ (2016): The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 136, 457–474

Moon M, Cha MY, Mook-Jung I (2014): Impaired Hippocampal Neurogenesis and its Enhancement with Ghrelin in 5XFAD Mice. *J Alz Dis* 41, 233–241

Morawski M, Schilling S, Kreuzberger M, Waniek A, Jager C, Koch B, Cynis H, Kehlen A, Arendt T, Hartlage-Rübsamen M et al. (2014): Glutaminyl cyclase in human Kortex. Correlation with (pGlu)-amyloid-beta load and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Alz Dis* 39, 385–400

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

Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ (1992): Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267, 17082–17086

Morris GP, Clark IA, Vissel B (2014): Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Commun* 2, 135 doi: 10.1186/s40478-014-0135-5

Müller U, Winter P, Graeber MB (2013): A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 12, 129–130

Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum DJ (2000): Correlation Between Elevated Levels of Amyloid β -Peptide in the Brain and Cognitive Decline. *JAMA* 283, 1571–1577

Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H. (2005): The Montreal Cognitive Assessment, MoCA. A brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 53, 695–699

Nazem A, Sankowski R, Bacher M, Al-Abed Y (2015): Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm* 12, 74 doi: 10.1186/s12974-015-0291-y

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 β -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

Oh SW, Harris JA, Ng L, Winslow B, Cain N, Mihalas S, Wang Q, Lau C, Kuan L, Henry AM et al. (2014): A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature* 508, 207–214

Paillard T, Rolland Y, Souto Barreto P (2015): Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. A Narrative Review. *J Clin Neuro* 11, 212–219

Pan H, Wang D, Zhang X, Zhou D, Zhang H, Qian Q, He X, Liu Z, Liu Y, Zheng T et al. (2016): Amyloid β Is Not the Major Factor Accounting for Impaired Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice Overexpressing Amyloid Precursor Protein. *Stem Cell Rep* 7, 707–718

Panza F, Frisardi V, Imbimbo BP, Seripa D, Paris F, Santamato A, D'Onofrio G, Logroscino G, Pilotto A, Solfrizzi V (2011): Anti-beta-amyloid immunotherapy for Alzheimer's disease. Focus on bapineuzumab. *Curr Alzheimer Res* 8, 808–817

Pardridge WM (2005): The Blood-Brain Barrier. Bottleneck in Brain Drug Development. *Neurotherapeutics* 2, 3–14

Patel KR (2015): Biogen's aducanumab raises hope that Alzheimer's can be treated at its source. *Manag Care* 24, 19 PMID: 26182718

Petersen RC (2004): Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 256, 183–194

Portelius E, Bogdanovic N, Gustavsson MK, Volkman I, Brinkmalm G, Zetterberg H, Winblad B, Blennow K (2010): Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 120, 185–193

Price JL, McKeel DW, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, Hansen LA, Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW et al. (2009): Neuropathology of Nondemented Aging. Presumptive Evidence for Preclinical Alzheimer Disease. *Neurobiol Aging* 30, 1026–1036

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O (2008): Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28, 14537–14545

Qiu C, Backman L, Winblad B, Aguero-Torres H, Fratiglioni L (2001): The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. *Arch Neurol* 58, 2034–2039

Reisberg B, Ferris SH, Leon MJ, Crook T (1982): The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 139, 1136–1139

Reitz C, Mayeux R (2014): Alzheimer disease. Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88, 640–651

Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M et al. (2007): The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27, 7817–7826

Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, Mathis CA, Blennow K, Barakos J, Okello AA et al. (2010): 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab. A phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol* 9, 363–372

Roberts SB, Ripellino JA, Ingalls KM, Robakis NK, Felsenstein KM (1994): Non-amyloidogenic cleavage of the beta-amyloid precursor protein by an integral membrane metalloendopeptidase. *J Biol Chem* 269, 3111–3116

Rodríguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A (2008): Impaired Adult Neurogenesis in the Dentate Gyrus of a Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Plos One* 3, doi: 10.1371/journal.pone.0002935.

Rogers J, Kirby LC, Hempelman SR, Berry DL, McGeer PL, Kaszniak AW, Zaluski J, Cofield M, Mansukhani L, Willson P et al. et al. (1993): Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1609–1611

Ryan NS, Rossor MN (2010): Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. *Biomark Med* 4, 99–112

Rygiel K (2016): Novel strategies for Alzheimer's disease treatment. An overview of anti-amyloid beta monoclonal antibodies. *Indian J Pharmacol* 48, 629–636

Saido TC, Yamao-Harigaya W, Iwatsubo T, Kawashima S (1996): Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci Lett* 215, 173–176

Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH et al. (2009): A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73, 2061–2070

Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Ferris S et al. (2014): Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 370, S. 322–333

Scarmeas N, Levy G, Tang MX, Manly J, Stern Y (2001): Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease. *Neurology* 57, 2236–2242

Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Luchsinger JA (2006): Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. *Arch Neurol* 63, 1709–1717

Scheff SW, Price DA (1993): Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33, 190–199

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ (2007): Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501–1508

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

Schlenzig D, Rönicke R, Cynis H, Ludwig HH, Scheel E, Reymann K, Saido T, Hause G, Schilling S, Demuth HU (2012): N-Terminal pyroglutamate formation of A β 38 and A β 40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *J Neurochem* 121, 774–784

Selkoe DJ (1996): Amyloid β -Protein and the Genetics of Alzheimer's Disease. *J Biol Chem* 271, 18295–18298

Selkoe DJ, Hardy J (2016): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595–608

Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Watzet A, David J, Vanmechelen E, Sergheraert C et al. (2003): Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 85, 1581–1591

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011): Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspect Biol* 1, doi: 10.1101/cshperspect.a006189

Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y et al. (2017): Addendum. The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 546, 564 doi: 10.1038/nature19323

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

Shimizu T, Watanabe A, Ogawara M, Mori H, Shirasawa T (2000): Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 381, 225–234

Siemers ER, Sundell KL, Carlson C, Case M, Sethuraman G, Liu-Seifert H, Dowsett SA, Pontecorvo MJ, Dean RA, Demattos R (2016): Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement* 12, 110–120

Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J et al. (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402, 537–540

Sisodia SS (1992): Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6075–6079

Smith JC, Nielson KA, Woodard JL, Seidenberg M, Durgerian S, Hazlett KE, Figueroa CM, Kandah CC, Kay CD, Matthews MA et al. (2014): Physical activity reduces hippocampal

atrophy in elders at genetic risk for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 6, 61 doi: 10.3389/fnagi.2014.00061

Solans A, Estivill X, La Luna S (2000): A new aspartyl protease on 21q22.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenet Cell Genet* 89, 177–184

Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E (1997): Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4109–4112

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, JR, Kaye J, Montine TJ et al. (2011): Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease. Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 280–292

Stewart R, Masaki K, Xue QL, Peila R, Petrovitch H, White LR, Launer LJ (2005): A 32-year prospective study of change in body weight and incident dementia. The Honolulu-Asia Aging Study. *Arch Neurol* 62, 55–60

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

Taniuchi N, Niidome T, Goto Y, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2007): Decreased proliferation of hippocampal progenitor cells in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Neuroreport* 18, 1801–1805

Tanzi RE, Bertram L (2005): Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis. A Genetic Perspective. *Cell* 120, 545–555

Tayeb HO, Murray ED, Price BH, Tarazi FI (2013): Bapineuzumab and solanezumab for Alzheimer's disease. Is the 'amyloid cascade hypothesis' still alive? *Expert Opin Biol Ther* 13, 1075–1084

Tom SE, Hubbard RA, Crane PK, Haneuse SJ, Bowen J, McCormick WC, McCurry S, Larson EB (2015): Characterization of Dementia and Alzheimer's Disease in an Older Population. Updated Incidence and Life Expectancy With and Without Dementia. *Am J Public Health* 105, 408–413

Tomiyama T, Asano S, Furiya Y, Shirasawa T, Endo N, Mori H (1994): Racemization of Asp23 residue affects the aggregation properties of Alzheimer amyloid beta protein analogues. *J Biol Chem* 269, 10205–10208

Town T (2009): Alternative A β Immunotherapy Approaches for Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disorder-Dr* 8, 114–127

Venkataramani V, Wirths O, Budka H, Härtig W, Kovacs GG, Bayer TA (2012): Antibody 9D5 recognizes oligomeric pyroglutamate amyloid- β in a fraction of amyloid- β deposits in Alzheimer's disease without cross-reactivity with other protein aggregates. *J Alz Dis* 29, 361–371

Vetrivel KS, Zhang Y, Xu H, Thinakaran G (2006): Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* 1, 4 doi: 10.1186/1750-1326-1-4

Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, Szoeker C, Macaulay SL, Martins R, Maruff P et al. (2013): Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease. A prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12, 357–367

Vykhodtseva N, McDannold N, Hynynen K (2008): Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. *Ultrasonics* 48, 279–296

Wada H, Nakajoh K, Satoh-Nakagawa T, Suzuki T, Ohru T, Arai H, Sasaki H (2001): Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 47, 271–276

Walker JR, Pacoma R, Watson J, Ou W, Alves J, Mason DE, Peters EC, Urbina HD, Welzel G, Althage A et al. (2013): Enhanced proteolytic clearance of plasma Abeta by peripherally administered neprilysin does not result in reduced levels of brain Abeta in mice. *J Neurosci* 33, 2457–2464

Wang A, Das P, Switzer RC, Golde TE, Jankowsky JL (2011): Robust Amyloid Clearance in a Mouse Model of Alzheimer's Disease Provides Novel Insights into the Mechanism of Amyloid- Immunotherapy. *J Neurosci* 31, 4124–4136

Wang L, Larson EB, Bowen JD, van Belle G (2006): Performance-based physical function and future dementia in older people. *Arch Intern Med* 166, 1115–1120

Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, van Eldik LJ (2014): Using mice to model Alzheimer's dementia. An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* 5, 88 doi: 10.3389/fgene.2014.00088

Weiner MF, Vobach S, Olsson K, Svetlik D, Risser RC (1997): Cortisol secretion and Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry* 42, 1030–1038

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 1858–1862

Wen Y, Yang SH, Liu R, Perez EJ, Brun-Zinkernagel AM, Koulen P, Simpkins JW (2007): Cdk5 is involved in NFT-like tauopathy induced by transient cerebral ischemia in female rats. *Biochim Biophys Acta* 1772, 473–483

Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D (2003): Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci* 23, 3745–3751

Wingo TS, Lah LJ, Levey AI, Cutler DJ (2012): Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease. *Arch Neurol* 69, 59–64

Winslow BT, Onysko MK, Stob CM, Hazlewood KA (2011): Treatment of Alzheimer disease. *Am Fam Physician* 83, 1403–1412

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* 91, 513–520

Wirhth O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth HU, Bayer TA (2009): Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118, 487–496

Wirhth O, Bethge T, Marcello A, Harmer A, Jawhar S, Lucassen PJ, Multhaup G, Brody DL, Esparza T, Ingelsson M et al. (2010a): Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm* 117, 85–96

Wirhth O, Breyhan H, Marcello A, Cotel MC, Brück W, Bayer TA (2010b): Inflammatory changes are tightly associated with neurodegeneration in the brain and spinal cord of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 747–757

Wirhth O (2017): Altered neurogenesis in mouse models of Alzheimer disease. *Neurogenesis* 4, doi: 10.1080/23262133.2017.1327002

Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T (2009): Abeta immunotherapy. Intrazerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta. *J Neurosci* 29, 11393–11398

Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990): Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein. Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279–282

Zhang XM, Cai Y, Xiong K, Cai H, Luo XG, Feng JC, Clough RW, Struble RG, Patrylo PR, Yan XX et al. (2009): BACE1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease

is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis. Implication for neuritic plaque development. *Eur J Neurosci* 30, 2271–2283

Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011): APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4, 3 doi: 10.1186/1756-6606-4-3

Zheng H, Koo EH (2006): The amyloid precursor protein. Beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5 doi:10.1186/1750-1326-1-5

Zigman WB, Devenny DA, Krinsky-McHale SJ, Jenkins EC, Urv TK, Wegiel J Schupf N, Silverman W (2008): Alzheimer's Disease in Adults with Down Syndrome. *Int Rev Res Ment Ret* 36, 103–145

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas A. Bayer für die Vergabe eines so interessanten Themas und die intensive Betreuung während der Zeit im Labor danken. Mir werden unsere lehrreichen Gespräche, sein ehrliches Interesse und die funkensprühende Faszination für das Gebiet in sehr guter Erinnerung bleiben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Yvonne Bouter, die mir vor, während und nach der Laborzeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand und von der ich sehr viel gelernt habe. Ich bedanke mich insbesondere für die unermüdliche und herzliche Umgehensweise, auch wenn ich es ihr nicht immer leicht gemacht habe.

Ich möchte mich herzlich bei Petra Tucholla, der guten Fee des Labors, für die Engelsgeduld im Umgang mit uns Doktorranden, die von Generation zu Generation die gleichen Fehler im Laboralltag machen, wobei ich keinen einzigen ausgelassen habe, bedanken.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Wirths und Jose Socrates Lopez-Noguerola für die Denkanstöße, Ratschläge und Hilfestellungen im Labor bedanken.

Zuletzt möchte ich bei Nico Giessen und Philipp Henniges dafür bedanken, dass ich während meiner Laborzeit in dieser Abteilung nicht nur viel gelernt habe, sondern auch zwei gute Freunde gewonnen habe.