

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

# **Quantitative Analysen hippocampaler Interneuronen in zwei transgenen Alzheimer Mausmodellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Naomi Kristin Giesers**

aus

Oldenburg

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

**Betreuungsausschuss**

Betreuer/in Prof. Dr. rer. nat. O. Wirths

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

**Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. rer. nat. O. Wirths

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Dresbach

Drittreferent/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 22.09.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Quantitative Analysen hippocampaler Interneuronen in zwei transgenen Alzheimer Mausmodellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Oldenburg, den .....

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Giesers N, Wirths O (2020):** Loss of Hippocampal Calretinin and Parvalbumin Interneurons in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ASN Neuro*, 12:1759091420925356.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Morbus Alzheimer.....	1
1.2 Pathologien der Alzheimer-Krankheit.....	3
1.3 Transgene Mausmodelle.....	5
1.3.1 Das 5xFAD-Mausmodell.....	6
1.3.2 Das Tg4-42-Mausmodell.....	7
1.4 Umwelteinflüsse und Prävention.....	9
1.5 Interneuronen und Calcium-bindende Proteine.....	10
1.6 Hypothese und Zielsetzung.....	14
1.6.1 Projekt 1: Erhebung der Interneuronen-Zahlen in zwei transgenen Mausmodellen.....	14
1.6.2 Projekt 2: Verbindung der Amyloid-Pathologie mit den Interneuronen-Zahlen im 5xFAD-Mausmodell.....	14
1.6.3 Projekt 3: Körperliche Aktivität und dessen Auswirkung auf die Interneuronen-Zahlen in zwei transgenen Mausmodellen.....	15
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Reagenzien.....	16
2.2 Mausmodelle.....	17
2.2.1 Genetischer Hintergrund.....	17
2.2.2 Tg4-42-Mauslinie.....	17
2.2.3 5xFAD-Mauslinie.....	17
2.2.4 <i>Standard Housing</i> .....	18
2.2.5 <i>Enriched Environment</i> .....	18
2.3 Vorbereitung der Schnitte.....	18
2.3.1 Paraffin Schnitte.....	18
2.3.2 Kryostat Schnitte.....	18
2.4 Immunhistochemische Färbungen.....	19
2.4.1 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Free Floating Immunfärbung.....	19
2.4.2 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Immunfärbung von Paraffinschnitten.....	20
2.5 Antikörper.....	22
2.5.1 Primäre Antikörper.....	22

2.5.2	Sekundäre Antikörper .....	22
2.6	Auswertung.....	23
2.6.1	Einteilung des Hippocampus für die Auswertung .....	23
2.6.2	Quantitative Analyse mittels <i>Meander Scan</i> .....	24
2.6.3	Analysen mit <i>ImageJ</i> .....	24
2.6.4	Statistik .....	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1	Parvalbumin.....	25
3.1.1	Auszählung der Parvalbumin-positiven Zellen in den WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mauslinien .....	25
3.1.2	Verlust von Parvalbumin-positiven Zellen in der 5xFAD-Mauslinie.....	25
3.1.3	Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Anzahl Parvalbumin-positiver Zellen	27
3.2	Calretinin.....	30
3.2.1	Auszählung der Calretinin-positiven Zellen in den WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mauslinien .....	30
3.2.2	Verlust von Calretinin-positiven Zellen im CA1 in der 5xFAD-Mauslinie.....	31
3.2.3	Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Anzahl Calretinin-positiver Zellen.....	32
3.3	Calbindin .....	35
3.3.1	Analyse der Calbindin-positiven Fläche in den WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mauslinien .....	35
3.3.2	Verlust von Calbindin-positiver Fläche im Hippocampus in der 5xFAD-Mauslinie .....	36
3.3.3	Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Immunreaktion Calbindin-positiver Fläche.....	37
3.4	Amyloid-Plaques.....	40
3.4.1	Analyse der Amyloid-Pathologie in der 5xFAD-Mauslinie .....	40
3.4.2	Flächenanteil der Amyloid-Plaques am höchsten im Gyrus Dentatus.....	40
3.4.3	Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Amyloid-Plauepathologie .....	41
3.4.4	Korrelation der Interneuron-Verluste mit dem Amyloid-Plaue-Anteil.....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1	Calcium-bindende Proteine und ihre Bedeutung für die Zelle im Rahmen einer Alzheimer Erkrankung .....	44
4.2	Der Einfluss der Amyloid-Pathologie auf die Zahl der Interneuronen.....	48
4.3	Der Einfluss der EE-Bedingungen auf die Zahl der Interneuronen .....	49
4.4	Limitationen und methodische Einschränkungen.....	51
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	52
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Amyloid-Plaques .....	3
Abbildung 2: Humanes Amyloid-Vorläuferprotein (APP) .....	4
Abbildung 3: Amyloidose in 5xFAD-Tieren .....	7
Abbildung 4: Transgenes Konstrukt und Prozessierung im Tg4-42-Mausmodell .....	8
Abbildung 5: EF-Hand mit Helix-Schleife-Helix-Struktur .....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der analysierten Regionen im Hippocampus	23
Abbildung 7: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen .....	26
Abbildung 8: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von WT- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	27
Abbildung 9: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von Tg4-42- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	28
Abbildung 10: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von 5xFAD-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	29
Abbildung 11: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von WT-, Tg4- 42- und 5xFAD-Mäusen .....	31
Abbildung 12: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von WT- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	32
Abbildung 13: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von Tg4-42- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	33
Abbildung 14: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von 5xFAD- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	34
Abbildung 15: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von WT-, Tg4- 42- und 5xFAD-Mäusen .....	36
Abbildung 16: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von WT- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	37
Abbildung 17: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von Tg4-42- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	38
Abbildung 18: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von 5xFAD- Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	39
Abbildung 19: Analyse der Flächenanteile der Amyloid-Plaques in 5xFAD-Mäusen....	41
Abbildung 20: Analyse der Flächenanteile der Amyloid-Plaques im Hippocampus von 5xFAD-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen .....	42
Abbildung 21: Korrelationen der PV-, CR- und CB-positiven Zahlen unter SH- Bedingungen mit dem Plaque Anteil der Mauslinien WT, Tg4-42 und 5xFAD.	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien und Färbekits .....	16
Tabelle 2: Primäre Antikörper .....	22
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper .....	22
Tabelle 4: Ergebnisse der Quantifizierung der Parvalbumin-positiven Zellen.....	25
Tabelle 5: Ergebnisse der Quantifizierung der Calretinin-positiven Zellen.....	30
Tabelle 6: Ergebnisse der Quantifizierung der Calbindin-positiver Flächen.....	35
Tabelle 7: Ergebnisse der Quantifizierung der Amyloid-Plaques in der 5xFAD- Mauslinie .....	40

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid-Beta
AD	<i>Alzheimer Disease</i> oder auch Alzheimer'sche Demenz
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CB	Calbindin
CR	Calretinin
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EE	<i>Enriched Environment</i>
FAD	<i>Familiar Alzheimer Disease</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GD	<i>Gyrus Dentatus</i>
MMST	<i>Mini-Mental-Status-Test</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Salt Solution</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PS	Präsenilin
PV	Parvalbumin
SH	<i>Standard Housing</i>
TRH	<i>Thyreotropin-Releasing Hormon</i>
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Alzheimer

Im frühen 20. Jahrhundert arbeitete Alois Alzheimer als Arzt in einer Psychiatrie in Frankfurt am Main. Er beobachtete bei einigen Patienten eine auffällige, frühauftretende Demenzform. Nach dem Tod der ersten Patientin beschrieb er seine pathologischen Ergebnisse wie folgt:

„Im mikroskopischen Bilde war im Bielschowsky-Präparat eine eigenartige Degeneration der Ganglienzellen der Hirnrinde auffällig, deren wesentliche Merkmale darin bestanden, dass sich ihre Fibrillen zusammenklumpten, die Färbbarkeit änderten und den Zerfall der Zelle überdauerten, so dass schließlich zu Knäueln zusammengerollte oder schlingenförmig zusammengebogene Fibrillenbündel als einzige Reste der Zelle im Gewebe lagen; (...)“ (Alzheimer 1911).

Bereits 1910 wurde die neu entdeckte Krankheit zum ersten Mal als Alzheimer-Krankheit in einem medizinischen Lehrbuch beschrieben. Heutzutage ist einiges mehr über die Alzheimer-Krankheit, oder auch Morbus Alzheimer oder Alzheimer'sche Demenz (AD) genannt, bekannt. Jedoch haben alle bisherigen wissenschaftlichen Bemühungen zu keinen wesentlichen therapeutischen Errungenschaften geführt. Die Alzheimer-Krankheit macht weltweit mindestens 60% aller Demenzformen aus. Weltweit leiden ca. 50 Millionen Menschen an Demenz, davon ca. 1,6 Millionen in Deutschland. Die Tendenz ist weltweit stark steigend. Von den erfassten Erkrankten sind mindestens doppelt so viele Frauen betroffen (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. 2020). Fest steht, der stärkste Risikofaktor für die Alzheimer-Krankheit stellt das Alter dar. Das Risiko zu erkranken verdoppelt sich alle 5 Jahre ab einem Alter von 65 Jahren (Querfurth und LaFerla 2010). Besonders deutlich lässt sich dieser Anstieg der Altersprävalenz bei Frauen beobachten, was mit der höheren Lebenserwartung der Frauen erklärt werden könnte (von Strauss et al. 1999). Es wird erwartet, dass sich die weltweite Anzahl der Demenzfälle bis 2040 mindestens verdoppelt (Mayeux und Stern 2012). Dadurch steigen auch die Kosten, die durch die Betreuung und Therapie der Demenz-Erkrankung und somit auch vor allem durch die der Alzheimer-Erkrankten für die weltweiten Gesundheitssysteme entstehen (Mount und Downton 2006).

Die Alzheimer-Krankheit gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen und bildet darunter den größten Anteil. Sie ist eine fortschreitende Erkrankung und schon Jahre bevor sich die ersten Symptome zeigen, können in den Gehirnen der

Erkrankten die ersten pathologischen Anzeichen gefunden werden (Bäckman et al. 2004). Es gibt zwei wesentliche Krankheitsformen, zwischen denen bei der Alzheimer-Krankheit unterschieden wird. Zum einen die sehr viel häufigere *Late-onset* Alzheimer-Krankheit oder auch sporadische Alzheimer-Krankheit genannt und zum anderen die seltene *Early-onset* Alzheimer-Erkrankung oder auch Familiäre Alzheimer-Krankheit (FAD) genannt mit Beginn vor dem 65. Lebensjahr (DGPPN und DGN 2016). Die *Early-onset* Alzheimer-Krankheit macht ca. 5% aller Alzheimer-Demenzen aus (Zhu et al. 2015). Bei ca. 1% aller Alzheimer-Erkrankten kann eine genetische Ursache der Erkrankung nachgewiesen werden. Zu den ersten Symptomen gehören Defizite des episodischen Gedächtnisses und ein Verlust von Alltagskompetenzen. Im Verlauf kommen weitere Symptome, wie aphasische Störungen oder Aggressivität hinzu (DGPPN und DGN 2016).

Für die erste grobe klinische Einordnung von Demenzen steht der *Mini-Mental-Status-Test* (MMST) zur Verfügung (Folstein et al. 1975). Nach dem Ergebnis des MMST kann die Alzheimer-Krankheit in drei Stadien eingeteilt werden: Leichte Alzheimer-Erkrankung (MMST:  $\geq 20$  Pkt.), Moderate Alzheimer-Erkrankung (MMST:  $\geq 10$  Pkt.) oder schwere Alzheimer-Erkrankung (MMST:  $< 10$  Pkt.) (DGPPN und DGN 2016). Zur weiteren Eingrenzung der verschiedenen Demenzformen, insbesondere der Alzheimer-Krankheit stehen weitere Untersuchungsmethoden zur Verfügung: eine ausführliche neuropsychologische Testung, der Amyloid-Nachweis mittels Positronen-Emissions-Tomographie und die Liquordiagnostik (Untersuchung von Tauprotein und A $\beta$ 1-42) (DGPPN und DGN 2016).

## 1.2 Pathologien der Alzheimer-Krankheit

Der Morbus Alzheimer wird von diversen hirneigenen Pathologien definiert: Amyloid-Plaques, Tau-Fibrillen, Inflammation, Vaskuläre Veränderungen und Neuronenverlust. Die Tau-Fibrillen, welche intrazelluläre *Neurofibrilläre Tangles* bilden, stellen eine der Hauptpathologien der Alzheimer-Krankheit dar (Hernández und Avila 2008). Sie bestehen aus hyperphosphorylierten, gepaarten helikalen Tau-Filamenten (Kidd 1963). Inwiefern sich die Tau-Pathologie und die Amyloid-Hypothese gegenseitig bedingen konnte noch nicht endgültig geklärt werden (Hernández und Avila 2008), es gibt aber Hinweise, dass die Tau-Pathologie der Amyloid-Pathologie vorausgeht (Bloom 2014).

Die klassische Amyloid-Hypothese besagt, dass das Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP), einem integralem Membranprotein, von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase ausgeschnitten wird (Hardy und Higgins 1992; Nhan et al. 2015). Dabei entstehen verschiedene  $A\beta$  Formen unterschiedlicher Länge, v.a. das  $A\beta$ -40, aber auch das  $A\beta$ -42 (siehe Abbildung 2). Vor allem das  $A\beta$ -42 hat eine hohe Neigung Oligomere zu bilden und lagert sich schnell extrazellulär zu Amyloid-Plaques zusammen (siehe Abbildung 1) (Selkoe 2001). Die  $\gamma$ -Sekretase besteht unter anderem aus den Proteinen Präsenilin 1 (PS1) bzw. 2 (PS2). Laut der Amyloid-Hypothese führen die entstandenen Amyloid-Plaques zu einer inflammatorischen Immunantwort, zu den *Neurofibrillären Tangles* und zum Absterben von Nervenzellen (Hardy und Higgins 1992).

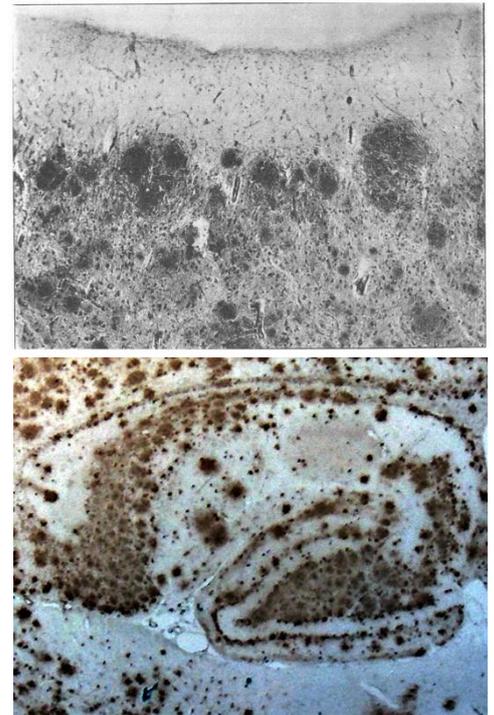


Abbildung 1: Amyloid-Plaques im Kortex erstmalig gezeigt von Alois Alzheimer (1911) (oben, gemeinfrei) und im Hippocampus der 5xFAD-Mauslinie (unten).

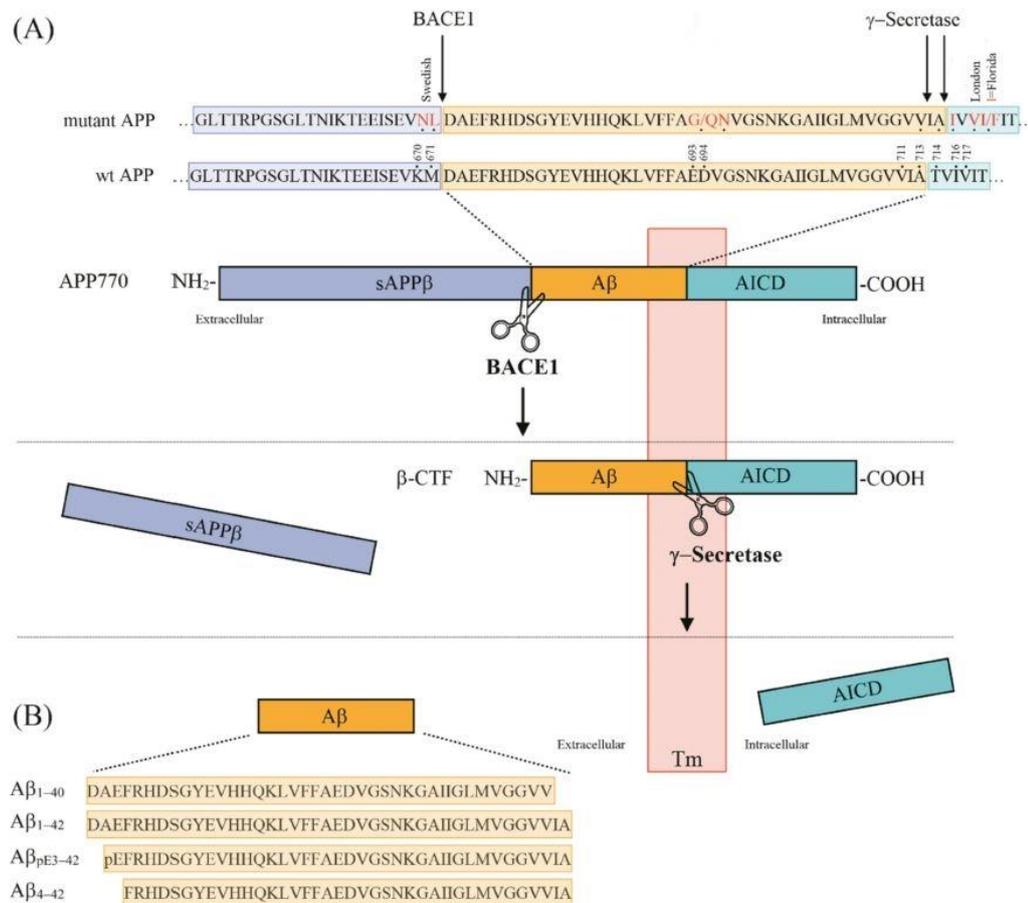


Abbildung 2: Humanes Amyloid-Vorläuferprotein (APP) (A) Schematische Darstellung von mutiertem und Wildtyp (WT) humanem APP mit Kennzeichnung der Positionen der Mutationen, die in der 5xFAD-Mauslinie verwendet werden (Swedish, London und Florida). Die Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase (BACE1) initiiert die Bildung von A $\beta$ -Peptiden mit der Freisetzung des löslichen sAPP $\beta$ -Fragments. Das membrangebundene C-terminale APP-Fragment wird weiter durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex gespalten, um A $\beta$  und die intrazelluläre APP-Domäne freizusetzen. (B) Aminosäuresequenzen und Nummerierung der häufigsten A $\beta$ -Varianten, die in transgenen Alzheimer-Mausmodellen vorliegen. Modifiziert nach Wirths und Zampar (2020) CC BY 4.0.

Im Laufe der Zeit wurde eine modifizierte Amyloid-Hypothese entwickelt. Schon 1985 wurde intrazelluläres A $\beta$  gefunden (Masters et al. 1985). Bei Mausmodellen, die keine extrazellulären Amyloid-Plaques bilden kam es trotzdem zu Zellverlusten und Verhaltensauffälligkeiten. Es stellte sich heraus, dass das schädliche A $\beta$  nicht nur extrazellulär vorkommt, sondern auch intrazellulär akkumuliert (Wirths et al. 2004). Der genaue Wirkmechanismus intrazellulärer A $\beta$ -Toxizität ist nicht geklärt, eine Möglichkeit scheint die Bildung toxischer A $\beta$ -Oligomere zu sein (Bayer und Wirths 2010). Die intraneuronalen Amyloid-Ablagerungen gehen der Bildung extrazellulärer Plaques voraus (Wirths et al. 2002). In einem Mausmodell mit extrazellulären Amyloid-Plaques und massiver intraneuronaler A $\beta$ -Akkumulation (APP/PS1KI), konnte ein robuster Neuronenverlust von Cornu Ammonis 1(CA1)-

Neuronen im Hippocampus gezeigt werden (Casas et al. 2004). Zugleich wurde beobachtet, dass das A $\beta$  auch Synapsen schädigen kann und zu einem Ungleichgewicht des neuronalen Netzwerkes führt (Palop und Mucke 2010). Es wird zudem vermutet, dass ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Eliminierung der Amyloid-Peptide zur Akkumulation und Plaque-Pathologie beiträgt (Jiang et al. 2008; Selkoe und Hardy 2016).

Die genetische Forschung brachte einige neue Erkenntnisse für die Alzheimer-Forschung. Die Eiweißvariante Apolipoprotein E4 wird mit einem erhöhten Risiko für die Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht (Seshadri et al. 1995). Außerdem wurden viele Gene gefunden, in denen Mutationen mit der Entwicklung einer Alzheimer-Pathologie assoziiert sind (Jansen et al. 2019). In den Genen *APP*, *PS1* (*Präsenilin 1*) und *PS2* (*Präsenilin 2*) führen autosomal dominante Mutationen zur Ausprägung einer *Early-onset* Alzheimer-Erkrankung (Tanzi und Bertram 2001).

Der Hippocampus ist eine der Schlüsselstellen des Gehirns für die Alzheimer-Krankheit, da er eine wichtige Rolle für die Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis führt. Dieser Bereich ist von den pathologischen Veränderungen der Alzheimer-Krankheit stark betroffen. Die vorherrschenden Pathologien im Hippocampus sind extrazelluläre A $\beta$ -Plaques, Anhäufung von *Neurofibrillären Tangles*, Neuroinflammation und Zellverlusten (Selkoe 2001).

Im Laufe der Zeit legte die Forschung vermehrt einen Fokus auf den Neuronenverlust. Zu Beginn war die Konzentration auf die Degeneration der großen Pyramidenzellen oder exzitatorischen Neuronen gerichtet (Pearson et al. 1985). Ein starker Neuronenverlust in den Gehirnen von Alzheimer Patienten wurde mehrfach beobachtet (Mountjoy et al. 1983). Vor allem in dem CA1-Band des Hippocampus und im entorhinalen Kortex ist dieser Zellverlust zu verzeichnen und spiegelt sich auch in einer Reihe von transgenen Alzheimer-Mausmodellen wieder (Wirhth und Zampar 2020).

### 1.3 Transgene Mausmodelle

Seit den 90er-Jahren werden transgene Mausmodelle für die Erforschung der Alzheimer-Erkrankung genutzt. Diese Mausmodelle weisen eine oder mehrere der verschiedenen Pathologien der Erkrankung auf: intrazelluläres A $\beta$ , Amyloid-Plaques, Neuronenverlust, Inflammation oder Tau-Pathologie. So können diese verschiedenen Pathologien einzeln oder im Zusammenhang erforscht werden. Die FAD eignet sich besonders gut, um in transgenen Mäusen erforscht zu werden, da Mutationen bekannt sind, die zu den entsprechenden Pathologien führen. Zur Generierung einer transgenen Mauslinie werden die Transgene in einen einzelligen Embryo injiziert.

Das Transgen enthält die kodierende Region, oft in Form einer komplementären Desoxyribonukleinsäure (DNA) des interessierenden Proteins, gekoppelt an einen Promotor, der die Expression steuert. Transgene können jedoch auch aus Segmenten genomischer DNA bestehen, die das interessierende Gen enthalten, oft in Form von bakteriellen künstlichen Chromosomen, wobei das Transgen durch seinen nativen Promotor und Enhancer angetrieben wird. Das injizierte Transgen integriert sich zufällig, typischerweise in mehreren Kopien an einer einzigen Stelle. Im Gegensatz dazu wird beim Gene-Targeting kein fremdes Transgen eingeführt, sondern das entsprechende Gen in Stammzellen modifiziert und dann in Mäuseembryonen eines Wildtyp(WT)-Tieres injiziert. Dadurch entstehen chimäre Tiere und weiterfolgend stabile Mauslinien. Es wurden bisher um die 100 verschiedene Mausmodelle durch Modifikationen des *APP*- oder der *PS1/2*-Gene generiert (Elder et al. 2010).

Diese *APP/PS*-Mauslinien, wie z. B. die 5xFAD-Mauslinie repräsentieren mit ihrer durch die Mutationen bedingten starken Amyloid-Pathologie die seltene familiäre Alzheimerform (FAD) (Oakley et al. 2006). Die sehr viel häufiger vorkommende sporadische Alzheimerform wird durch diese Mausmodelle nicht ausreichend charakterisiert. Eines der näher an die sporadische Form angelehnte Mausmodell ist das Tg4-42-Mausmodell, welches ohne *APP*-Mutation A $\beta$  intrazellulär exprimiert (Boutter et al. 2013). Beide Mauslinien haben einen ähnlichen Verhaltens-Phänotyp der gealterten Mäuse (zwölf Monate). Dieser äußert sich in räumlichen Lerndefiziten, Defiziten in der Wiedererkennungsrates von Objekten und einer beeinträchtigten kontextuellen Konditionierung (Boutter et al. 2014).

### 1.3.1 Das 5xFAD-Mausmodell

Die in dieser Arbeit verwendeten 5xFAD-Mäuse wurden über mehr als 10 Generationen mit C57Bl/6J WT-Mäusen (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) rückgekreuzt, um eine Linie auf einem C57Bl/6J genetischen Hintergrund zu erzeugen. Die 5xFAD-Mäuse überexprimieren die 695-Aminosäure-Isoform des menschlichen *APP* mit den Mutationen Swedish, Florida und London unter der Kontrolle des Nervenzell-spezifischen murinen Thy1-Promotors (siehe Abbildung 2). Zusätzlich wird humanes *PS1*, welches die Mutationen M146L und L286V trägt, unter Verwendung desselben Promotors exprimiert. Diese häufig verwendeten Mäuse haben eine relativ frühe und aggressive Ausprägung des typischen AD-ähnlichen Phänotyps. Die Mäuse zeigen eine Reihe von Verhaltens- und motorischen Defiziten. Sie entwickeln einen altersabhängigen motorischen Phänotyp, zusätzlich zu Defiziten im Arbeitsgedächtnis und reduziertem Angstverhalten. Die ersten Verhaltensauffälligkeiten entwickeln die 5xFAD-Mäuse mit 4-5 Monaten (Oakley et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass 5xFAD-Mäuse im Elektroenzephalogramm eine höhere Erregbarkeit und

hippocampale Rhythmusstörungen als entsprechende WT-Tiere aufweisen (Siwek et al. 2015). Die Amyloid-Pathologie ist bei Weibchen stärker ausgeprägt als bei Männchen. Auch die Entzündungsreaktion ist bei den weiblichen Mäusen früher zu beobachten und weibliche Tiere reagieren vulnerabler auf Stressereignisse (Devi et al. 2010; Manji et al. 2019). Die extrazelluläre Amyloid-Ablagerung beginnt etwa im Alter von zwei Monaten, zunächst im Subiculum und in der Schicht V des Kortex, und nimmt mit zunehmendem Alter rasch zu. Bis zum sechsten Lebensmonat sind Plaques im gesamten Hippocampus und Kortex zu finden; bei älteren Mäusen sind Plaques im Thalamus, Hirnstamm und Riechhirn vorhanden, fehlen aber weitestgehend im Kleinhirn (siehe Abbildung 3). Der Neuronenverlust tritt in mehreren Hirnregionen auf, beginnend mit etwa neun Monaten in kortikalen Bereichen mit ausgeprägter Amyloidose (Eimer und Vassar 2013). Neurofibrilläre Tangles sind bei diesem Modell nicht typisch (Oakley et al. 2006). 5xFAD-Mäuse zeigen einen signifikanten selektiven Neuronenverlust in Schicht V des Kortex und im Subiculum, wobei die Gesamtneuronenanzahl des gesamten frontalen Kortex und Hippocampus unbeeinträchtigt bleibt. Diese Beobachtung

deckt sich mit der Akkumulation von intraneuronalen A $\beta$ -Peptiden nur in der kortikalen Schicht V, nicht aber in CA1, trotz vergleichbarer APP-Expressionslevel (Jawhar et al. 2012). In dem Mausmodell 5xFAD/Tg30 in dem das 5xFAD-Mausmodell mit dem Mausmodell Tg30 mit einer Tau Pathologie gekreuzt wurde, konnte ein Zellularuntergang der Pyramidenzellen im Hippocampus beobachtet werden (Héraud et al. 2014). In einer Neuroimaging Studie wurde in den 5xFAD-Mäusen eine 10%ige Abnahme des Hippocampus-Volumens beobachtet (Macdonald et al. 2014).



Abbildung 3: Amyloidose in 5xFAD-Tieren (2-fache Vergrößerung, gefärbt mit dem 4G8-Antikörper)

### 1.3.2 Das Tg4-42-Mausmodell

Das Tg4-42-Mausmodell wurde so entwickelt, dass es ausschließlich das Peptid A $\beta$ 4-42 produziert. A $\beta$ 4-42 ist eine von mehreren am N-Terminus verkürzten A $\beta$ -Varianten, die im Gehirn von Alzheimer-Erkrankten identifiziert wurden. Das A $\beta$ 4-42-Peptid, das mit einem Phenylalanin an Position vier beginnt, ist möglicherweise eine besonders häufige Form von am N-Terminus verkürztem A $\beta$  im menschlichen Gehirn (Masters et al. 1985; Portelius et al. 2010). Das Tg4-42-Mausmodell wurde

generiert, um die sporadische Alzheimer-Form widerzuspiegeln. Das Mausmodell exprimiert kein humanes APP, also werden die Effekte des A $\beta$ 4-42 nicht durch APP oder andere Spaltprodukte verfälscht. Das *Tg4-42-Transgen* beinhaltet die *A $\beta$ 4-42-Sequenz* fusioniert mit dem murinen *Thyrotropin-Releasing-Hormon (TRH)*-Signalpeptid unter der Kontrolle des Thy1-Promotors, wodurch das A $\beta$  in einer neuronenspezifischen Weise sezerniert werden kann (siehe Abbildung 4). Die Expression des Transgens ist am höchsten im Hippocampus, vorwiegend in der CA1-Region, und ist ab einem Alter von etwa zwei Monaten nachweisbar. Das Transgen wird auch im okzipitalen Kortex, im piriformen Kortex, im Striatum und im Colliculus superior exprimiert. Das Tg4-42-Mausmodell entwickelt keine extrazellulären Amyloid-Plaques, das sezernierte A $\beta$ 4-42 bildet jedoch leicht lösliche, neurotoxische Aggregate. Tg4-42-Mäuse entwickeln alters- und dosisabhängig einen neuronalen Verlust im Hippocampus in der CA1-Region sowie eine Inflammation. In Verhaltenstests zeigen diese Mäuse ein altersabhängiges räumliches Lerndefizit im Morris-Wasserlabyrinth-Test. Dieses Defizit entwickelt sich nach etwa sechs Monaten bei homozygoten Tieren und nach bis zu zwölf Monaten bei heterozygoten Tieren (Bouter et al. 2013; Antonios et al. 2015). Außerdem zeigen die Tiere in einem Alter von sechs Monaten Defizite in Tests für das Wiedererkennen von bekannten Objekten (Stazi und Wirths 2021a).

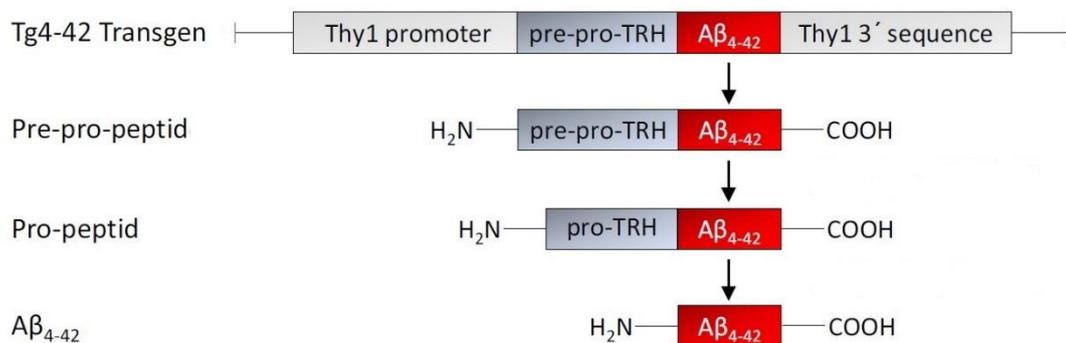


Abbildung 4: Transgenes Konstrukt und Prozessierung im Tg4-42-Mausmodell. Das Tg4-42-Transgen steht unter der Kontrolle des Thy1-Promotors. Unter seiner Kontrolle wird das Pre-pro-peptid sezerniert. Im Endoplasmatischen Retikulum wird dann durch eine Signalpeptidase das Pro-Peptid freigesetzt, um dann im Golgi-Apparat durch Prohormonkonvertasen gespalten zu werden. Es entsteht so das freie A $\beta$ 4-42. Modifiziert nach Hüttenrauch (2016).

## 1.4 Umwelteinflüsse und Prävention

Um Präventionsmaßnahmen für Demenzen und im speziellen für den Morbus Alzheimer zu entwickeln, wurde nach möglichen Umwelteinflüssen und Risikofaktoren gesucht. Einer der stärksten Risikofaktoren ist das Alter. Das Risiko an der Alzheimer-Krankheit zu erkranken steigt ab dem 65. Lebensjahr exponentiell an (Querfurth und LaFerla 2010). Hinzu kommen kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Adipositas, Rauchen, Hyperlipidämie, Bluthochdruck und Diabetes (Whitmer et al. 2007; Beydoun et al. 2008; Livingston et al. 2017; Snowden et al. 2017). Damit ergeben sich präventive Maßnahmen, die auf die Prävention von kardiovaskulären Risikofaktoren abzielen. Regelmäßige Bewegung ist somit ein naheliegender Präventionsfaktor für die Alzheimer-Erkrankung. Der positive Effekt von regelmäßiger Bewegung auf die bestehende Alzheimer-Krankheit konnte in einigen Studien beobachtet werden (Heyn et al. 2004; Scarmeas et al. 2011; Coelho et al. 2014; Phillips et al. 2015). Auch der präventive Effekt von regelmäßiger physischer Aktivität auf die Entwicklung einer späteren Alzheimer-Krankheit wurde in einigen (Meta-)Studien bewiesen (Friedland et al. 2001; Blondell et al. 2014).

In Mausmodellen können Umwelteinflüsse in präklinischen Studien untersucht werden. Ein etabliertes System ist das *Enriched Environment* (EE) (Rosenzweig et al. 1964). Hier spielt die ermöglichte vermehrte Bewegung (durch einen größeren Käfig und einem Laufrad) und eine gewisse kognitive Stimulation durch modulare Einrichtung der Käfige eine Rolle. Schon WT-Mäuse profitieren kognitiv von den EE-Bedingungen. Sie haben eine höhere Neuronenzahl im CA1-Band des Hippocampus und zeigen auch ein verbessertes räumliches Gedächtnis (Hüttenrauch et al. 2016a). In einigen Alzheimer-Mausmodellen konnte der positive Effekt der EE-Bedingungen auf die Anzahl der Amyloid-Plaques und auf Verhaltensdefizite der Tiere beobachtet werden (Adlard et al. 2005; Lazarov et al. 2005; Hu et al. 2010; García-Mesa et al. 2011; Liu et al. 2013; Balthazar et al. 2018; Zhang et al. 2018; Stuart et al. 2019; Wang et al. 2019). Es wurden jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht, bei denen die Plaque-Anzahl unter den EE-Bedingungen zu nahm (Jankowsky et al. 2003), oder gar kein Effekt der EE-Bedingungen beobachtet wurde (Arendash et al. 2004; Richter et al. 2008; Cotel et al. 2012). Auch in der in dieser Arbeit vorgestellten 5xFAD-Mauslinie konnte bisher kein Effekt der EE-Bedingungen beobachtet werden (Hüttenrauch et al. 2017). In der Tg4-42-Mauslinie konnte in diversen Studien ein positiver Effekt der EE-Bedingungen auf das Verhalten der Mäuse und auf den Neuronenverlust bestätigt werden (Hüttenrauch et al. 2016b; Gerberding et al. 2019; Stazi und Wirths 2021b).

## 1.5 Interneuronen und Calcium-bindende Proteine

Interneuronen sind Nervenzellen, welche nicht aus einer Hirnregion herausprojizieren, sondern innerhalb der Hirnregion die Nervenzellen miteinander verschalten. Sie können inhibitorisch oder exzitatorisch sein (Tremblay et al. 2016). Die Vielfalt der Interneuronen könnte erforderlich sein, um ein Gleichgewicht zwischen Hemmung und Erregung im Neokortex zu erreichen (Markram et al. 2004). Die hier betrachteten Interneuronen sind inhibitorisch und inhibieren über  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Diese Zellen stellen im Hippocampus 10-15% des lokalen Schaltkreises dar und regulieren und synchronisieren das neuronale Netzwerk (Pelkey et al. 2017).

Parvalbumin (PV), Calretinin (CR) und Calbindin (CB) gehören zu der Gruppe der Calcium-bindenden Proteine. Diese Proteine beinhalten alle mind. eine EF-Hand, deshalb wird diese Protein-Familie auch EF-Hand-Protein-Familie genannt. Die EF-Hand ist die Calcium-bindende Struktur der Proteine mit einer Helix-Schleife-Helix-Struktur (siehe Abb. 1). PV trägt drei der EF-Hand-Motive und CR und CB jeweils sechs. Zu dieser Protein-Familie gehören außerdem unter anderem die S100-Proteine, Troponin C, Calmodulin und Calcineurin (Heizmann 1992).

Die PV-positiven Zellen stellen die größte Gruppe der GABAergen Interneuronen dar (Rudy et al. 2011). PV-positive Zellen haben dicke, myelinisierte Axone (Celio 1990) und sie bilden Synapsen untereinander und zu Pyramidenzellen aus (Klausberger 2009). Die PV-positiven Zellen tragen wesentlich zur Synchronisation des neuronalen Netzwerkes bei (Klausberger et al. 2005; Hu et al. 2010; Ognjanovski et al. 2017; Xia et al. 2017; Espinoza et al. 2018). Der Verlust der PV-positiven Zellen ist mit einer Verschlechterung oszillatorischer Rhythmen, der Netzwerk-Synchronität und des Gedächtnisses assoziiert (Verret et al. 2012).

Im Hippocampus der Ratte wurden CR-positive Zellen untersucht, die in allen Schichten des Hippocampus zu finden sind. Sie bilden häufig dendro-dendritische und axo-dendritische Kontakte untereinander aus und bilden so ein Netzwerk. Eine CR-positive Zelle steht im Durchschnitt mit drei bis sieben anderen CR-positiven Zellen in Kontakt. Sie innervieren vor allem CR-positive Zellen. Somit kontrollieren CR-positive Zellen vor allem andere Interneuronen im Hippocampus.

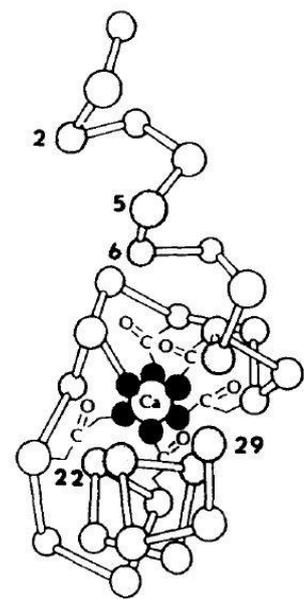


Abbildung 5: EF-Hand mit Helix-Schleife-Helix-Struktur. Modifiziert nach Baimbridge et al. (1992). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Höchstwahrscheinlich spielen sie durch die Kontrolle anderer Interneuronen eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung synchroner, rhythmischer Hippocampus-Aktivität (Gulyás et al. 1996).

CB-positive Zellen haben dünne, nicht myelinisierte Axone (Celio 1990). Die primären Zielzellen inhibitorischer CB-positiven Interneuronen sind die Pyramidenzellen und Pyramidenzell-Dendriten im Hippocampus (Gulyás et al. 1996). Wenn die Hippocampi humaner Gehirne in Hinblick auf die Anfärbbarkeit CB-positiver Zellen mit Hippocampi von Mäusen verglichen werden, stellen sich große Unterschiede dar. Es wurde vermutet, dass technische Fehler und Einschränkungen bei der Beurteilung menschlicher Gehirne zu diesen Unterschieden führten. Gleichzeitig gibt es die Möglichkeit, dass die Gehirne von Mäusen und Menschen in Hinblick auf die Interneuronen biologisch sehr unterschiedlich sind (Merino-Serrais et al. 2020). CB wird eine neuroprotektive Eigenschaft zugesprochen (Mattson et al. 1991; Iacopino et al. 1992). Es ist vor allem im Gyrus Dentatus (GD) in den Körnerzellen, in den Neuronen im CA2-Bereich des Hippocampus und in den Interneuronen aller Hirnregionen vorhanden (Sloviter et al. 1991). CB ist eines der wichtigsten Calcium-bindenden Proteine, das neuromodulatorische Funktionen wie Langzeitpotenzierung (LTP), synaptische Plastizität und Gedächtnisfunktionen beeinflusst. Der Verlust der CB-Immunreaktivität im GD unterscheidet die Alzheimer-Krankheit von anderen neurodegenerativen Demenzen (Stefanits et al. 2014).

Im gesamten Körper sind Calcium-bindende Proteine im Gewebe vorhanden. In vielen Zellen sind gleichzeitig zwei oder mehr der verschiedenen Proteine zu finden. Die meisten Pyramidenzellen im Kortex und im Hippocampus beinhalten kein PV oder CB. Somit kann man diese Proteine im Hippocampus als Marker für Interneuronen betrachten (Baimbridge et al. 1992). Im menschlichen Hippocampus wurde gezeigt, dass CB die Körnerzellen des GD und Pyramidenzellen von CA2 anfärbt, während PV nur Interneuronen anfärbt (Leuba et al. 1998). CB-bindende Zellen sind in den Körnerzellen und allen Schichten des GD und des Ammonshornes des Hippocampus zu finden. Am häufigsten sind sie in der Molekularschicht des GD und in der Pyramidenschicht des Ammonshorns lokalisiert. Die meisten der PV-positiven Zellen sind in der Nähe der Zellverbände im Hippocampus lokalisiert. Viele wurden auch in der Molekularschicht des GD und in den Strata oriens des Ammonshorns gefunden. Die CB- und PV-haltigen Neuronen bilden ähnliche Subpopulationen in Nagetieren, Affen und Menschen, obwohl der menschliche Hippocampus die größte Variabilität dieser immunreaktiven Neuronen in ihrer Morphologie und Lokalisation aufweist (Seress et al. 1993). Alle oder die Mehrzahl der CB-, PV- und CR-immunreaktiven Zellen gehören zu den glatten nichtpyramidalen Interneuronen, die an einer Vielzahl komplexer kortikaler Schaltkreise beteiligt sind, die sich je nach

Spezies, kortikalem Gebiet oder Schicht, in der sie sich befinden, unterscheiden können (DeFelipe 1997).

Der Calcium-Stoffwechsel ist wichtig für die Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität und des neuronalen Netzwerkes. Veränderungen des Calciumstoffwechsels sind an neurodegenerativen Prozessen wie auch der Alzheimer-Krankheit beteiligt (Mattson 2007). Die Calcium-bindenden Proteine fungieren als Calcium-Puffer, um das Calcium-Gleichgewicht aufrecht zu erhalten (Baimbridge et al. 1992; German et al. 1997; Gall et al. 2003) und sind somit wichtig für die Aufrechterhaltung der Calcium Homöostase und damit für die Gedächtnisbildung (Molinari et al. 1996). Es wird angenommen, dass eine abnormale GD-Erregbarkeit und ein Versagen der inhibitorischen Neuronen, Aktionspotentiale zu erzeugen, wichtige Bestandteile der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen der Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit im Frühstadium sind (Hazra et al. 2013). Die Funktion neuronaler Schaltkreise und Netzwerke kann zum Teil durch die Modulation der Synchronität der Aktivitäten ihrer Komponenten gesteuert werden. Netzwerk-Hypersynchronie und veränderte oszillatorische rhythmische Aktivität können zu kognitiven Defiziten bei der Alzheimer-Krankheit beitragen. Die Funktionsstörung von Interneuronen und Netzwerkanomalien gelten als mögliche Mechanismen der kognitiven Dysfunktion bei Alzheimer und verwandten Erkrankungen (Palop und Mucke 2016).

Die Eigenschaften der Calcium-bindenden Proteine PV, CR und CB wurden im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit in den letzten Jahren vermehrt untersucht. Die Calcium-bindenden Proteine wurden in menschlichen Gehirnen, in verschiedenen Mausmodellen und in den verschiedenen, von Alzheimer betroffenen Hirnregionen analysiert.

Im menschlichen Gehirn von Alzheimer-Erkrankten konnte ein Verlust von PV-positiven Zellen (Sanchez-Mejias et al. 2020) und CR-positiven Zellen (Brion und Résoibois 1994) im entorhinalen Kortex, sowie im frontalen und temporalen Kortex (Arai et al. 1987), im olfaktorischen Kortex (Saiz-Sanchez et al. 2015) und im Hippocampus in den Subfeldern DG/CA4 und CA1/2 um ca. 60% (Brady und Mufson 1997) gezeigt werden. Ein CB-Verlust konnte im basalen Vorderhirn gezeigt werden (Gehula et al. 2003). Eine Abnahme von CB-positiven Zellen im alternden Gehirn des Menschen wurde im Kleinhirn, im Corpus striatum und im Nucleus basalis beobachtet, nicht aber im Neokortex und auch nicht im Hippocampus. Im Gehirn von an Alzheimer erkrankten Menschen konnte ein CB-Verlust ebenfalls im Hippocampus und im Nucleus basalis gesehen werden (Iacopino und Christakos 1990).

In einigen Studien wurde ein Verlust der Zellen, die Calcium-bindende Proteine exprimieren in Alzheimer-Modellen beobachtet. Im olfaktorischen Kortex in der

APP/PS1-Mauslinie wurde ein Verlust aller drei Zelltypen beobachtet (Saiz-Sanchez et al. 2012). Auch im GD konnte dieser Zellverlust bestätigt werden (Popović et al. 2008). Des Weiteren wurde eine verminderte Anzahl von PV-Neuronen (40-50%) im CA1/2 sowie von CR-Neuronen (37-52%) im GD und Hilus von APP/PS1 Mäusen gefunden. Interessanterweise wurden vergleichbare PV- und CR-Neuronenverluste im GD von postmortalen Gehirnproben von Patienten mit AD beobachtet (Baglietto-Vargas et al. 2010; Takahashi et al. 2010). Auch in der 3x-Tg-Mauslinie konnte ein entsprechender Verlust von PV- und CR-positiven Zellen gezeigt werden (Zallo et al. 2018). Die PV-positiven Zellen wurden in einmonatigen TgCRND8-Mäusen analysiert. Hierbei war die Abnahme der Anzahl der PV-positiven Zellen, die selektiv CA1/2 und Subiculum betraf auffällig, wobei die Pyramidenschicht von CA1/2 fast vollständig für die Abnahme der Anzahl der hippocampalen PV-positiven Zellen verantwortlich war (Mahar et al. 2016). In der gealterten Tg2576-Maus wurde gezeigt, dass der Anteil der PV-exprimierenden Interneuronen in der CA1/3-Region des Hippocampus signifikant vermindert ist (Huh et al. 2016). Eine Untersuchung des Calcium-bindenden Proteins CB in hAPP-Mäusen ergab einen verminderten CB-Spiegel in Körnerzellen des GD, der mit den Lerndefiziten der Mäuse korrelierte. Außerdem war der CB-Verlust altersabhängig und korrelierte mit der Zunahme von Amyloid-Plaques. Ein dementsprechender Verlust von CB-bindenden Interneuronen konnte hingegen nicht festgestellt werden (Palop et al. 2003). Im Kortex von 5xFAD-Mäusen wurde ein Verlust von PV-positiven Zellen beobachtet (Flanigan et al. 2014). Die Dichte der PV-positiven Zellen im frontalen Kortex war in den 5xFAD-Mäusen signifikant geringer als in entsprechenden Vergleichstieren (zwischen 39% und 50% Verlust der PV-Dichte) (Ali et al. 2019). In gealterten APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>-Mäusen konnte ein Verlust von PV-positiven Zellen im Hippocampus nachgewiesen werden (Verdaguer et al. 2015).

Zusätzlich wurde nicht nur ein absoluter Verlust, sondern auch eine morphologische Veränderung der Calcium-positiven Zellen beschrieben. In humanen Alzheimer Gehirnen wurden diese morphologischen Änderungen im entorhinalen Kortex beschrieben (Mikkonen et al. 1999). Im humanen temporalen Kortex wurde ein Größenverlust der PV-positiven Zellen beobachtet (Arai et al. 1987) und auch im visuellen Kortex in Gehirnen an Alzheimer erkrankter Personen verloren PV- und CR-positiven Zellen an Größe (Leuba et al. 1998).

Allerdings zeigen auch eine Reihe von älteren Studien unveränderte Spiegel an PV-, CR- und CB-positiven Zellen (Leuba et al. 1998; Hof et al. 1999). Dazu muss beachtet werden, dass sich die methodischen Möglichkeiten der Quantifizierung stark gewandelt und verbessert haben (Jinno und Kosaka 2006). Im humanen Neokortex wurde in diversen Studien kein Verlust der PV- und CR-positiven Zellen gefunden

(Ferrer et al. 1991; Hof et al. 1991; Fonseca und Soriano 1995; Leuba et al. 1998). Im entorhinalen Kortex von APP/PS1-Mäusen fehlte ebenfalls der Verlust von PV-positiven Zellen (Sanchez-Mejias et al. 2020).

## **1.6 Hypothese und Zielsetzung**

Die Neuroinflammation und der Zellverlust beim Morbus Alzheimer sind Hauptfelder der aktuellen Forschung. Inwiefern die Interneuronen und ihr möglicher Verlust eine Rolle bei der Erkrankung spielen ist von großem Interesse. Für die Mausmodelle 5xFAD und Tg4-42 waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung nur wenige bis keine Daten zu potentiellen Interneuronenverlusten im Hippocampus vorhanden. Der Hippocampus ist der Hauptort des „Gedächtnisses“ und bildet so beim Morbus Alzheimer einen neuronalen Schlüsselort. Zur Untersuchung inhibitorischer, GABA-erger Interneuronen sollten Immunhistochemische Färbungen der Calcium-bindenden Proteine verwendet werden.

### **1.6.1 Projekt 1: Erhebung der Interneuronen-Zahlen in zwei transgenen Mausmodellen**

In den Mausmodellen 5xFAD (stellvertretend für die FAD) und Tg4-42 (als Modell für die sporadische Alzheimer-Erkrankung) wurden in der vorliegenden Arbeit die Anzahl der PV-, CR- und CB-positiven Zellen und somit der Interneuronen quantifiziert, analysiert und verglichen. Ziel war es, die Interneuronen im Hippocampus dieser Mausmodelle vergleichend zu quantifizieren und in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext einzuordnen. Es wurde ein Interneuronen-Verlust in beiden Mausmodellen vermutet.

### **1.6.2 Projekt 2: Verbindung der Amyloid-Pathologie mit den Interneuronen-Zahlen im 5xFAD-Mausmodell**

Einer der wichtigen Unterschiede zwischen den beiden betrachteten Mausmodellen sind die in der 5xFAD-Mauslinie vorkommenden Amyloid-Plaques, welche in der Tg4-42-Mauslinie fehlen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Amyloid-Plaques auf die Interneuronen-Zahlen in den 5xFAD-Tieren zu charakterisieren. Es wurde eine relative Quantifizierung der Plaque-Pathologie in den 5xFAD-Mäusen durchgeführt, um eine mögliche Korrelation der Interneuronenverluste und der Amyloid-Pathologie nachzuvollziehen. Es wurde eine Korrelation zwischen den Amyloid-Plaques und den Interneuronenverlusten vermutet.

### **1.6.3 Projekt 3: Körperliche Aktivität und dessen Auswirkung auf die Interneuronen-Zahlen in zwei transgenen Mausmodellen**

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, den Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und den Interneuronen-Zahlen in den beiden untersuchten Mausmodellen, 5xFAD und Tg4-42 zu analysieren. Als Simulation für vermehrte physische Bewegung und kognitive Stimulation diente das EE. Es wurden die Zahlen der PV-, CR- und CB-positiven Zellen in Tieren im *Standard Housing* (SH) und im EE quantifiziert, analysiert und verglichen. Ziel war es, einen möglichen positiven Effekt der EE-Bedingungen auf die Interneuronen-Zahlen zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

In der folgenden Tabelle sind alle Reagenzien und Färbesets aufgelistet, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden.

Tabelle 1: Reagenzien und Färbekits

Reagenzien und Färbekits	Hersteller
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Histofix Lösung 4% Formalin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, fettarm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histokitt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DAB-Peroxidase Substrate Kit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Salt Solution (PBS)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ameisensäure, 98%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Hydroxid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek-Einbettmedium	Sakura Europe, Aalphen aan den Rijn, Niederlande

## 2.2 Mausmodelle

### 2.2.1 Genetischer Hintergrund

Die Untersuchungen wurden an bereits archivierten Hirnproben von Tieren im Alter von 12 Monaten durchgeführt. Alle Tiere wurden auf dem genetischen Hintergrund der verwendeten WT-Tiere (C57BL/6J) gehalten und waren allesamt weiblich. Die untersuchten Mauslinien (WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäuse) wurden in der Universitätsmedizin Göttingen unter standardisierten Bedingungen oder unter EE-Bedingungen gehalten.

### 2.2.2 Tg4-42-Mauslinie

Die Tg4-42-Mauslinie kann als Krankheitsmodell für die sporadische Form des Morbus Alzheimers betrachtet werden. Die Tg4-42-Linie exprimiert die kodierende DNA für Amyloid $\beta$ 4-42 mit dem Signalpeptid des Thyrotropin Releasing Hormon Gens unter der Kontrolle des mauseigenen Thy-1 Promoters. Dieser Promotor ist für die zelltypspezifische Expression in Nervenzellen verantwortlich. Das A $\beta$ 4-42 ist ein am Stickstoffende verkürztes Amyloid-Peptid, beginnend mit der an vierter Stelle vorkommenden Aminosäure Phenylalanin. Dieses besondere Amyloid-Peptid war eines der zuerst entdeckten und eines der häufigsten A $\beta$ -Peptide (Masters et al. 1985), welches in Amyloid-Plaques von Alzheimer Patienten gefunden wurde (Boutter et al. 2013). Im Rahmen dieser Studie wurden ausschließlich heterozygote Tiere der Tg4-42-Linie verwendet.

### 2.2.3 5xFAD-Mauslinie

Die 5xFAD-Mauslinie (Tg6799) kann als Krankheitsmodell für die familiäre Form des Morbus Alzheimers (*Familiar Alzheimer Disease* (FAD)) betrachtet werden. Diese Form des Morbus Alzheimers kann durch verschiedene Mutationen bedingt sein. Insbesondere Mutationen im *APP*- und im *PS1*- und *PS2*-Gen kodierenden Gen führen zur FAD. Beide Mutationen induzieren die Produktion von extrazellulären Amyloid-Peptiden, die sich nachfolgend in Amyloid-Plaques ablagern. Die 5xFAD-Mauslinie trägt fünf verschiedene Mutationen stellvertretend für die FAD: K670N/M671L Substitution im APP (Swedish Mutation), I716V Substitution im APP (Florida Mutation), V717I Substitution im APP (London Mutation) und die Mutationen im PS1 Gen (Oakley et al. 2006). Des Weiteren wurde in den letzten Jahren untersucht, inwiefern sich die Mutationen auf das Verhalten der Tiere auswirken. Die

5xFAD-Mäuse zeigten in Verhaltenstests wie dem *Water Maze* Lern- und Gedächtnisdefizite, die mit den kognitiven Defiziten bei Patienten mit Morbus Alzheimer vergleichbar sind (Jawhar et al. 2012).

#### **2.2.4 Standard Housing**

Die Mäuse im SH wurden in Gruppen von vier bis fünf Tieren in einem standardisierten Käfig (33 x 18 x 14 cm) gehalten. Der Käfig war mit standardisierter Einstreu und Nistmaterial ausgestattet. Wasser und Futter standen den Tieren unbegrenzt zur Verfügung (Hüttenrauch et al. 2016a).

#### **2.2.5 Enriched Environment**

Das EE als Modell für gesteigerte körperliche Aktivität im Alltag und kognitive Beanspruchung zeichnet sich durch einen größeren Käfig (55 x 34 x 20 cm) aus. Dieser enthält modulare Einrichtungen (Laufräder, Nistmaterial, Häuser), v. a. um eine vermehrte Bewegung der Mäuse zu ermöglichen. Einmal pro Woche wurde die Einrichtung variiert, um ein größeres Reizangebot für die Mäuse zu schaffen (Hüttenrauch et al. 2016a).

### **2.3 Vorbereitung der Schnitte**

#### **2.3.1 Paraffin Schnitte**

Die jeweils rechten Hemisphären der Mausgehirne wurden zur Herstellung der Paraffin Schnitte für die Immunhistochemie verwendet. Sie wurden in einem TP1020 Automaten (Leica, Deutschland) für eine automatische Gewebeeinfiltration über ein Dehydratationsprotokoll dehydriert. Danach wurden sie in einer EG1150 H Einbettmaschine (Leica, Deutschland) in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden die eingebetteten Präparate mit einem Mikrotom HM 335E (Thermo Fisher Scientific, USA) in 4 Mikrometer dicke Schnitte geschnitten und zum Entfalten in ein 55 °C heißes Wasserbad gelegt (Medax, Deutschland). Jeweils zwei bis drei Schnitte wurden zusammen auf einen Objektträger aufgezogen. Diese Objektträger wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet und konnten ab dem nächsten Tag (nach vollständiger Trocknung) für Färbungen verwendet werden.

#### **2.3.2 Kryostat Schnitte**

Die Mäuse wurden mit einer 4 %igen Paraformaldehydlösung (PFA) transkardial perfundiert, das Gehirn wurde präpariert und zwei Stunden in PFA nachfixiert. Es wurde dann in einer dreißigprozentigen Saccharose Lösung gefriereschützt, um es

danach bei -80 °C lagern zu können. Die Gehirne wurden zum Schneiden auf Trockeneis aus dem Gefrierschrank genommen und bei -20 °C in das Einbettmedium „Tissue-Tek“ eingebettet. In diesem wurde das Gehirn mithilfe eines Kryostats (CM1850 UV, Leica, Deutschland) frontal in 30 Mikrometer dicke konsekutive Schnitte geschnitten und gleichmäßig auf zehn Behälter verteilt. Dabei wurde jeder zehnte Schnitt in einem separaten Gefäß gesammelt, sodass zehn repräsentative Serien der Schnitte für die gesamte Hemisphäre entstanden. Diese wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Cotel et al. 2008).

## 2.4 Immunhistochemische Färbungen

### 2.4.1 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Free Floating Immunfärbung

Für jedes Tier der Versuchsreihe wurde an drei der zehn zuvor hergestellten Schnittserien ein Free Floating DAB-Färbung-Protokoll wie folgend beschrieben durchgeführt. Die Schnittserien wurden jeweils mit den drei Antikörpern PV, CR und CB gefärbt, um danach eine Quantifizierung der angefärbten Zellen durchzuführen. Die gefrorenen 30 µm dicken Hirnschnitte wurden innerhalb von 5 min aus der Kühlung in 0,01 M PBS gelöst und in eine 12-well Kulturplatte (Costar) gebracht. Dort wurden die Schnitte 10 min in 0,01 M PBS rehydriert. Anschließend erfolgte für 30 min ein Peroxidase Block mit 200 ml PBS und 2 ml 30 % Wasserstoffperoxid zur Blockierung gewebeeigener Peroxidasen. Die Schnitte wurden dreimal 10 min in 0,01 M PBS mit 0,1 % Triton und anschließend eine Minute in 0,01 M PBS gespült. Es folgte ein unspezifischer Block für 1 h mit 0,01 M PBS, 10 % FCS und 4 % Milchpulver, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Schnitte wurden in einer Lösung mit 0,01 M PBS, 10 % FCS und dem ausgewählten primären Antikörper bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 10 min in 0,01 M PBS mit 0,1 % Triton und 1 min in 0,01 M PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zum primären Antikörper passenden biotinylierten zweiten Antikörper wurde in 0,01 M PBS mit 10 % FCS für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte wurden dreimal 10 min in PBS gespült.

Anschließend folgte die Inkubation mit einem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) mit 0,01 M PBS, 10 % FCS, Lösung A und Lösung B jeweils 1:300 aus dem Vectastain ABC Kit. Die Inkubation erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dreimal 10 min in PBS gewaschen und mit dem DAB-Histokit (Vector) gefärbt. Dazu wurde nach Herstellerangaben eine Lösung aus destilliertem Wasser, Puffer, DAB und Wasserstoffperoxid hergestellt und für 2 min gefärbt. Danach wurden die Schnitte dreimal 10 min lang in PBS gewaschen. Nun wurden die Schnitte eines Tieres mit einem Pinsel auf zwei Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 37 °C

getrocknet. Am nächsten Tag wurde eine Gegenfärbung in Hämatoxylin durchgeführt, um Zellkerne darzustellen. Der letzte Schritt bestand aus einer Entwässerung mittels einer aufsteigenden alkoholischen Reihe, beginnend mit 1 min in 70 % Ethanol, 5 min in 90 % Ethanol, dann 10 min 100 % Ethanol und zweimal 10 min in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit zwei bis drei Tropfen Roti-Histokitt eingebettet und mit einem Deckgläschen versehen.

#### **2.4.2 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) Immunfärbung von Paraffinschnitten**

Für die Quantifizierung der extrazellulären Plaques wurde eine DAB-Färbung an Paraffinschnitten der drei Mauslinien (WT, Tg4-42 und 5xFAD) durchgeführt. Das Protokoll begann mit einer Deparaffinierung und anschließenden Rehydrierung. Diese umfasste sechs Stationen: zweimal 5 min in Xylol, 10 min in 100 % Ethanol, 5 min in 95 % Ethanol, 1 min in 70 % Ethanol und abschließend 1 min in destilliertem Wasser. Darauf folgte ein Peroxidase Block mit 200 ml PBS inklusive 2 ml Wasserstoffperoxid. Es folgte eine Spülung in destilliertem Wasser für 1 min. Für die Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte in 0,01 M Citrat Puffer mit einem leicht sauren PH-Wert von 6,0 aufgekocht. Der Puffer mit den enthaltenen Präparaten wurde in der Mikrowelle bei 1000 W bis zum Sieden erhitzt und für 10 min bei 200 W auf Temperatur gehalten. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Dann wurden die Objektträger für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen, bevor die Schnitte für 15 min in PBS mit 0,1 % Triton X-100 zur Permeabilisierung der Membranen inkubiert wurden. Anschließend wurde nochmals mindestens 1 min in PBS gewaschen und es folgte ein weiterer Schritt der Antigendemaskierung durch 3 minütige Inkubation in 88 % Ameisensäure (Wirhth et al. 2002). Danach wurde 2 mal 1 min in PBS gespült, gefolgt von einem unspezifischen Block der Oberflächenproteine für eine Stunde mit PBS inklusive 10 % FCS und 4 % Milchpulver. Die Blockierungslösung wurde ohne weiteren Waschschrift entfernt, die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrundet und mit 2-3 Tropfen einer PBS Lösung inklusive 10 % FCS und dem jeweiligen primären Antikörper benetzt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde 15 Minuten in PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen, gefolgt von 1 min in PBS. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper passend zum primären Antikörper in PBS inklusive 10 % FCS. Die Objektträger wurden so für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 10 min in PBS gewaschen und die Schnitte mit PBS inklusive 10 % FCS und Lösung A 1:100 und Lösung B 1:100 vom Vectastain ABC Kit für 1,5 Std bei 37 °C inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend für 15 Minuten in PBS gespült und

es folgte die Färbung mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) mit einem Kit von Vector Laboratories. Für 2 min wurde tropfenweise eine Lösung von 5 ml destilliertem Wasser, zwei Tropfen Puffer, vier Tropfen DAB und zwei Tropfen Wasserstoffperoxid auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden nach genau 2 min in PBS gespült. Um eine Zellkernfärbung zu gewährleisten wurden die Objektträger für 40 sek in Hämatoxylin gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte für 5 sek mithilfe von destilliertem Wasser und dann für 10 min unter laufendem Leitungswasser differenziert. Der letzte Schritt beinhaltete eine Entwässerung mittels einer aufsteigenden alkoholischen Reihe. Diese begann mit 1 min in 70 % Ethanol, gefolgt von 5 min in 90 % Ethanol, 10 min in 100 % Ethanol, 2-mal für 10 min in Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit zwei bis drei Tropfen Roti-Histokitt eingebettet und mit einem Deckgläschen versehen.

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller	Seriennummer
<b>Calretinin (CR)</b>	Maus, monoklonal	1:8.000	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	RRID: AB_2619906
<b>Parvalbumin (PV)</b>	Maus, monoklonal	1:4.000	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	RRID: AB_2619883
<b>Calbindin D-28k (CB)</b>	Kaninchen, monoklonal	1:15.000	Swant, Marly, Schweiz	
<b>4G8 (A<math>\beta</math>)</b>		1:1.000	Signet labs	RRID: AB_2313891

### 2.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller
<b>Anti Maus Biotinyliert</b>	Kaninchen, polyklonal	1:250	Dako, Santa Clara, USA
<b>Anti Kaninchen Biotinyliert</b>	Ziege, polyklonal	1:250	Dako, Glostrup, Dänemark

## 2.6 Auswertung

### 2.6.1 Einteilung des Hippocampus für die Auswertung

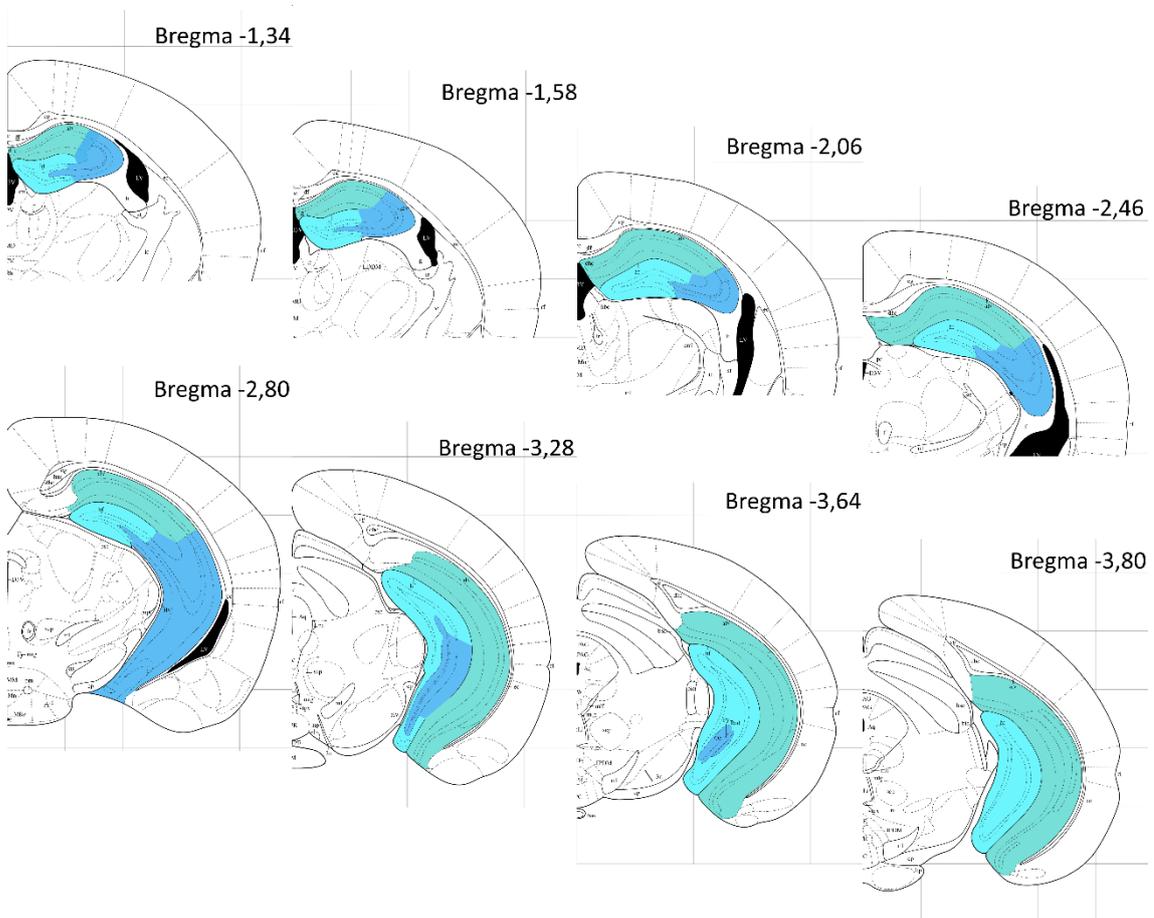


Abbildung 6: Schematische Darstellung der analysierten Regionen im Hippocampus. Alle Schnitte der Gehirne auf den Objektträgern wurden unter dem Mikroskop begutachtet und nach der Entfernung zum Bregma eingeordnet. Für die Analyse wurden alle Schnitte mit Bregma Entfernungen von -1,06mm bis -3,88mm berücksichtigt. Nach den in der Abbildung gezeigten Beispielen wurde der Hippocampus in drei verschiedene Bereiche eingeteilt (CA1, CA2/3 und GD). Das Schema basiert auf Franklin und Paxinos (2001) und wurde adaptiert von Giesers und Wirths (2020) CC BY-NC 4.0.

Der Hippocampus wurde für alle folgenden Auswertungen in drei Teile eingeteilt: CA1, CA2/3 und GD. Es wurden alle Schichten mit einer Entfernung zum Bregma zwischen -1,06mm bis -3,88mm der jeweiligen Regionen bei den verschiedenen Analysen berücksichtigt. Zu dem GD gehören das Stratum moleculare, das Stratum granulare und das Stratum polymorphe. Das CA wird in ein Stratum oriens, ein Stratum pyramidale, ein Stratum radiatum und ein Stratum lacunosum-moleculare eingeteilt (Franklin und Paxinos 2001).

### 2.6.2 Quantitative Analyse mittels *Meander Scan*

Für die Auswertung der immunhistochemisch im *Free-Floating*-Verfahren mit DAB gefärbten Schnitte wurden die Zellen mittels eines Stereologiemikroskops (Olympus BX51 mit motorisiertem Objektisch) und der Software StereoInvestigator 7.0 (MicroBrightfield) quantifiziert. Die Zellen wurden innerhalb der zuvor definierten Regionen CA1, CA2/3 und GD quantifiziert. Dazu wurden die entsprechenden Bereiche zunächst in einer 400-fachen Vergrößerung definiert, um dann in einer 1000-fachen Vergrößerung mit dem *Meander Scan* die komplette Region zu analysieren und die einzelnen, vom jeweiligen Antikörper und DAB angefärbten Zellen zu zählen. Da jeder zehnte Schnitt pro Tier analysiert wurde, wurde die gezählte Zahl der immunpositiven Zellen mit dem Faktor 10 multipliziert, um die endgültige Zahl der PV-, CR- und CB-positiven Zellen zu berechnen (Gerberding et al. 2019).

### 2.6.3 Analysen mit *ImageJ*

Für die Analysen mit dem Programm *ImageJ* (V 1.52a, NIH, USA) wurden von den zu vergleichenden Schnitten Bilder mit einem Olympus BX51 Mikroskop und einer digitalen Kamera (MoticamPro 282B, Motic, Deutschland) bei einer konstant gehaltenen Belichtungszeit und -intensität in einer 100-fachen Vergrößerung aufgenommen. Zur Analyse wurden diese Bilder mit dem Programm *ImageJ* geöffnet und die zu untersuchende Region oder einzelne Zellen definiert. Dann wurde das Bild zu einem 8bit Schwarz-Weiß-Bild konvertiert und anschließend wurde ein einheitlicher „*Threshold*“ Schwellenwert festgelegt. Es folgte die Analyse mit dem *ROI Manager*, der dann einen Flächenanteil („*Area Fraction*“) ermittelte, die eine Analyse der Intensität der DAB-Färbung und somit der Quantifizierung der durch den entsprechenden Antikörper gefärbten Zellen ermöglicht.

### 2.6.4 Statistik

Für die statistische Analyse der verschiedenen Versuche wurden ungepaarte t-Tests oder Einweg-Varianzanalysen (*One-way-ANOVA*) durchgeführt, gefolgt von entsprechenden post-HOC-Tests (*Turkey multiple comparison test*). Signifikanzen wurden definiert als \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  und \*\*\* $p < 0,001$ . Alle Daten wurden als Mittelwerte inklusive Standardabweichung vom Mittelwert definiert. Die gesamte Statistik wurde mit dem Programm *Graph Pad Prism 8.0.2* erstellt (GraphPad software, San Diego, USA). Die Kohortengröße (n) variiert je nach Gruppe und wird folgend in den Abbildungsbeschreibungen näher beschrieben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Parvalbumin

##### 3.1.1 Auszählung der Parvalbumin-positiven Zellen in den WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mauslinien

Zur vergleichenden Untersuchung der Zellzahlen der PV-bindenden Zellen in den WT-, Tg4-42- und 5xFAD- Mauslinien wurden die Zellen wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben mit einem PV-Antikörper angefärbt. Dann wurden die PV-positiven Zellen mittels des *Meander Scan* gezählt (siehe Kapitel 2.6.2). Anschließend wurden die Messwerte der verschiedenen Mauslinien WT-, Tg4-42- und 5xFAD Mäuse statistisch mit dem Programm *Graph Pad Prism* analysiert (siehe Kapitel 2.6.4). Die quantitative Auswertung ergab in den 5xFAD-Mäusen im Gegensatz zu WT- und Tg4-42-Tieren eine starke Abnahme der PV-bindenden Zellen.

Tabelle 4: Ergebnisse der Quantifizierung der Parvalbumin-positiven Zellen. Gefärbt wurden Schnitte von WT- (n = 7), Tg4-42- (n = 8) und 5xFAD-Mäusen (n = 5) mit einem PV-Antikörper. Mit Hilfe des *Meander Scans* wurden die angefärbten Neurone in drei verschiedenen Bereichen gezählt: CA1, CA2/3 und GD. In der Tabelle sind die ausgezählten absoluten Zahlen sowie die auf die WT SH normalisierten Zahlen dargestellt.

Parvalbumin	CA1	CA1 Norm.	CA2/3	CA2/3 Norm.	GD	GD Norm.	Gesamt	Gesamt Norm.
WT SH	6841	100%	2493	100%	1260	100%	10691	100%
WT EE	6356	93%	3174	127%	1194	95%	10724	100%
Tg4-42 <sup>het</sup> SH	6346	93%	2551	102%	1226	97%	10124	95%
Tg4-42 <sup>het</sup> EE	5625	82%	2399	96%	1143	91%	9225	86%
5xFAD SH	4090	60%	1210	49%	728	58%	5498	51%
5xFAD EE	3822	56%	1416	57%	938	74%	6176	58%

##### 3.1.2 Verlust von Parvalbumin-positiven Zellen in der 5xFAD-Mauslinie

In der Analyse der PV-bindenden Zellen wurde erkennbar, dass die 5xFAD-Mauslinie, verglichen zu den WT- und den Tg4-42-Mauslinien in allen drei eingeteilten Bereichen des Hippocampus (CA1, CA2/3 und GD) einen signifikanten Verlust in der Anzahl der PV-bindenden Zellen zeigten (\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Tg4-42-Mäusen in allen drei Bereichen kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den WT-Tieren.

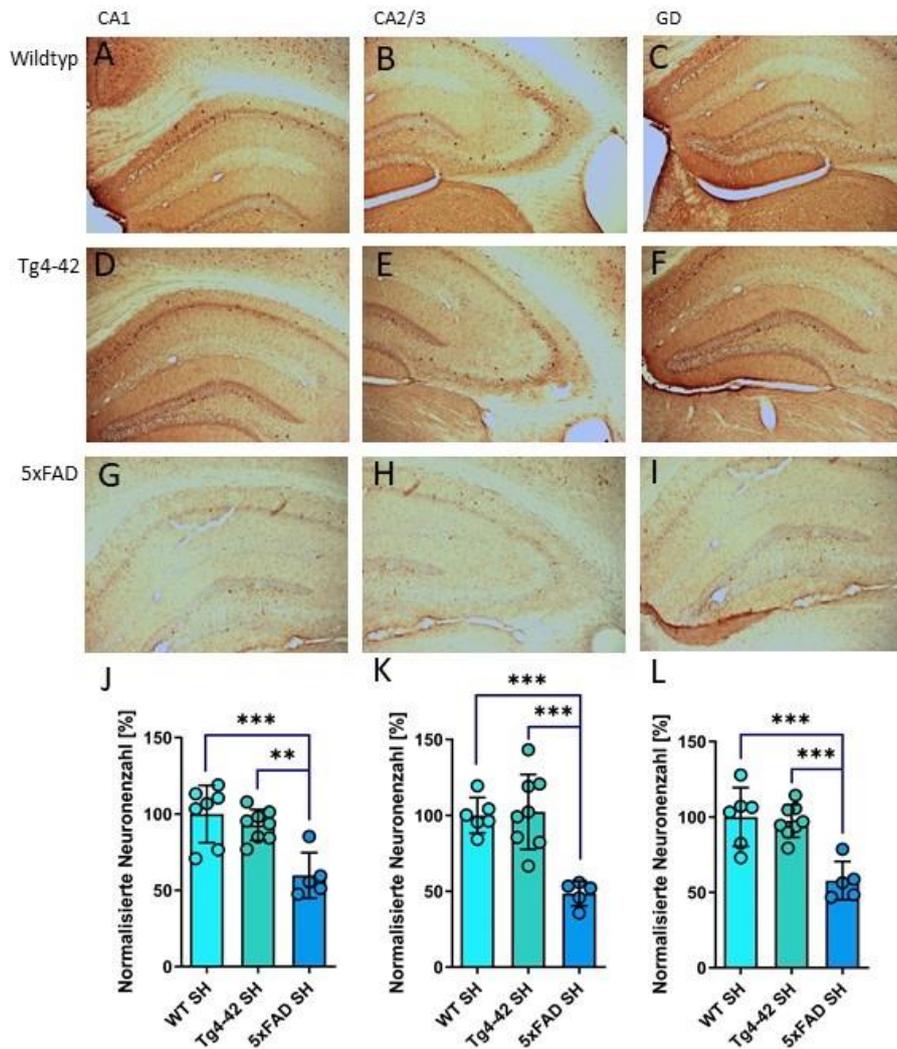


Abbildung 7: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen. Schnitte von WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen wurden mit einem PV-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbten Neurone mithilfe eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. In allen Gebieten (J)-(L) wurde ein signifikanter Unterschied der PV-positiven Zellzahlen der 5xFAD-Mäuse im Vergleich zu denen der WT- bzw. Tg4-42-Mäusen deutlich. Die Zahl der PV-positiven Zellen der 5xFAD-Mäuse ist bis zu 50 % geringer als die der anderen Linien. Die Zellzahl der Tg4-42- und 5xFAD-Mäuse wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Mäuse (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001. n = 5-8 pro Gruppe.

### 3.1.3 Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Anzahl Parvalbumin-positiver Zellen

#### 3.1.3.1 Leichte Steigerung der Parvalbumin-positiven Zellzahlen in WT-Mäusen unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der PV-bindenden Zellen zwischen SH-Bedingungen und EE-Bedingungen wurden die Zellzahlen mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den unter SH-Bedingungen gehaltenen WT-Mäusen im Vergleich zu den unter EE-Bedingungen gehaltenen Tieren im CA2/3 Bereich. Die Anzahl der mit dem Antikörper PV angefärbten Zellen der im EE gehaltenen WT-Mäuse war signifikant höher als bei den im SH gehaltenen WT-Tieren.

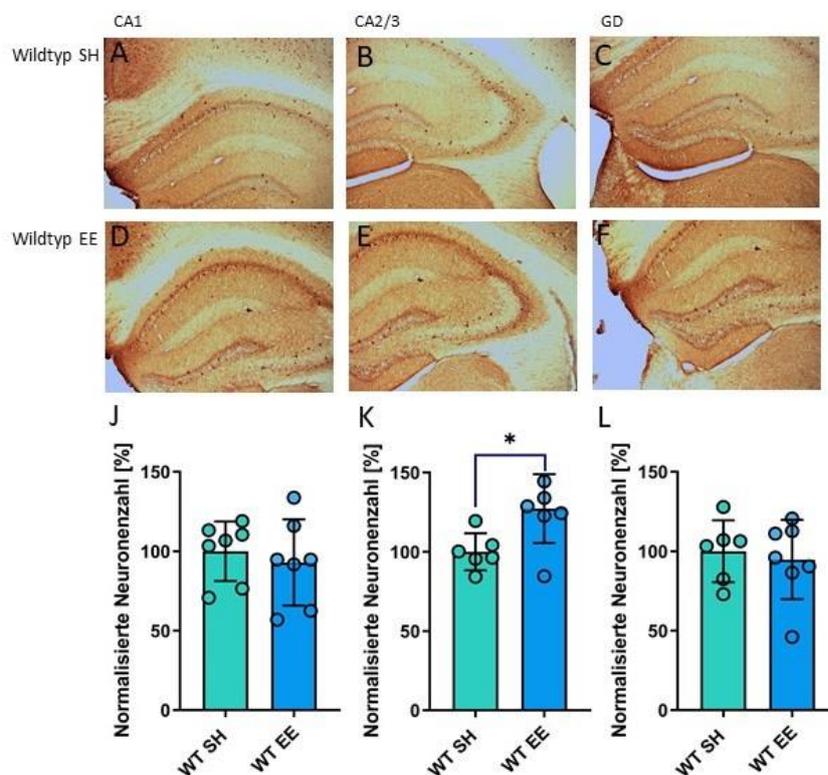


Abbildung 8: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von WT-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von WT-Mäusen wurden mit einem PV-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbten Neurone mithilfe eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Im CA2/3 (K) konnte ein signifikanter Unterschied der Neuronen Zahlen im SH zum EE in den WT-Tieren beobachtet werden. Die Neuronen Zahl der WT-Mäuse im EE wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Mäuse im SH (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \*p < 0,05. n = 7 pro Gruppe.

### 3.1.3.2 Leichter Verlust der Parvalbumin-positiven Zellen in Tg4-42- Mäuse unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der PV-bindenden Zellen zwischen SH und EE wurden die Interneuronen der Tg4-42-Mäuse gefärbt, gezählt und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den unter SH-Bedingungen gehaltenen Mäusen zu den unter EE-Bedingungen gehaltenen Tieren im CA1-Bereich. Die Anzahl der mit dem Antikörper PV angefärbten Zellen der im EE gehaltenen WT-Mäuse war signifikant (\* $p < 0,05$ ) niedriger als bei den im SH gehaltenen WT-Tieren.

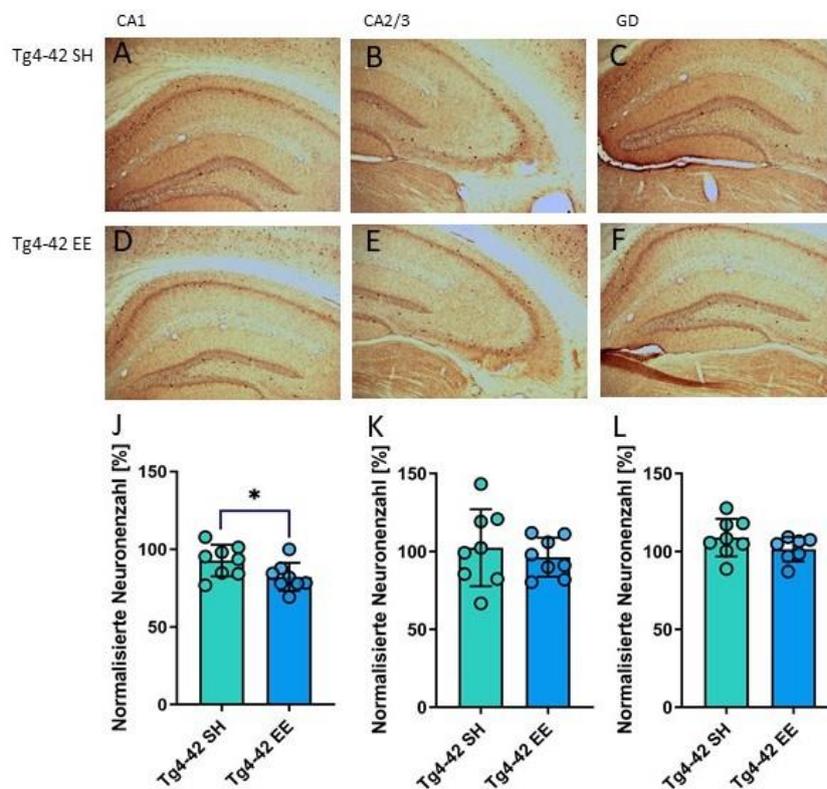


Abbildung 9: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von Tg4-42-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von Tg4-42-Mäusen wurden mit einem PV-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbten Neurone mittels eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Im CA1 (J) konnte ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen im SH im Vergleich zum EE der WT-Mäuse beobachtet werden. Die Neuronen Zahl der WT-Mäuse im EE wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Mäuse im SH (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \* $p < 0,05$ .  $n = 8$  pro Gruppe.

### 3.1.3.3 Keine signifikanten Unterschiede der Parvalbumin-positiven Zellen in der 5xFAD-Mauslinie unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der PV-bindenden Zellen der 5xFAD-Mäuse unter SH-Bedingungen und EE-Bedingungen wurden die Schnitte der 5xFAD-Mäuse gefärbt, quantifiziert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests ergaben keinen signifikanten Unterschied in allen Bereichen des Hippocampus zwischen den WT-Tieren im EE und im SH (\* $p < 0,5$ ).

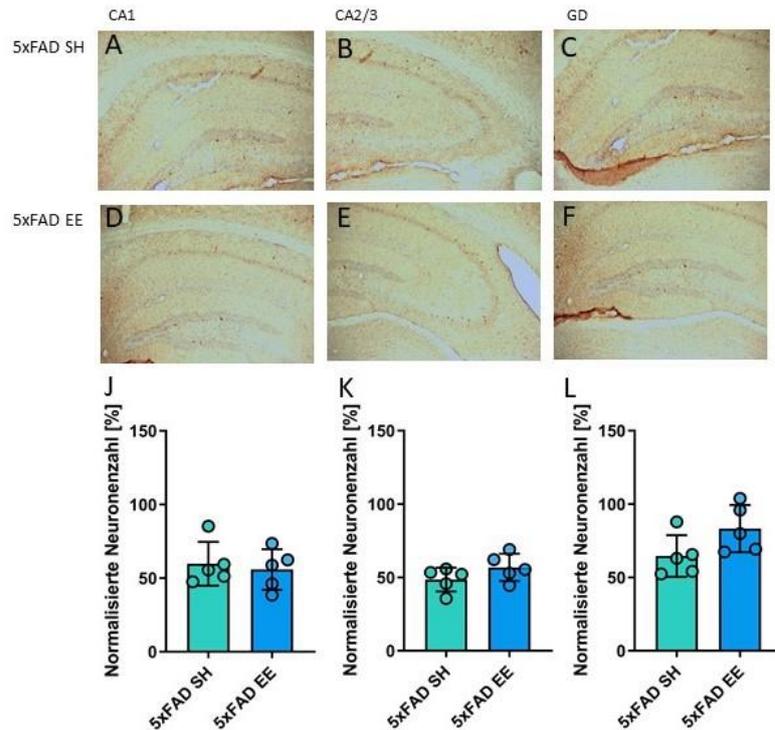


Abbildung 10: Analyse der Parvalbumin-positiven Zellen im Hippocampus von 5xFAD-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von 5xFAD-Mäusen wurden mit einem PV-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbten Neurone mithilfe eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Neuronen Zahlen im SH im Vergleich zum EE in den 5xFAD-Mäusen beobachtet werden. Die Neuronen Zahl der 5xFAD-Mäuse im EE wurde für die Analyse in Bezug auf die 5xFAD-Mäuse im SH (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n = 5$  pro Gruppe.

## 3.2 Calretinin

### 3.2.1 Auszählung der Calretinin-positiven Zellen in den WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mauslinien

Die CR-bindenden Zellen wurden wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben angefärbt, um eine Quantifizierung der Zellen mittels des Meanderscans durchzuführen (siehe Kapitel 2.6.2). Anschließend wurden die Zahlen der verschiedenen Mauslinien WT, Tg4-42 und 5xFAD statistisch mit dem Programm *Graph Pad Prism* analysiert (siehe Kapitel 2.6.4). Die quantitative Auswertung zeigte in den 5xFAD-Mäusen im Gegensatz zu WT- und Tg4-42-Tieren eine starke Abnahme der CR-bindenden Zellen.

Tabelle 5: Ergebnisse der Quantifizierung der Calretinin-positiven Zellen. Gefärbt wurden Schnitte von WT- (n = 7), Tg4-42- (n = 8) und 5xFAD-Mäusen (n = 5) mit einem CR-Antikörper. Mithilfe eines Meanderscans wurden die angefärbten Zellen in drei verschiedenen Bereichen gezählt: CA1, CA2/3 und GD. In der Tabelle sind die ausgezählten absoluten Zahlen sowie die auf die WT SH normalisierten Zahlen dargestellt.

Calretinin	CA1	CA1 Norm.	CA2/3	CA2/3 Norm.	GD	GD Norm.	Gesamt	Gesamt Norm.
WT SH	6904	100%	2630	100%	5694	100%	15229	100%
WT EE	5620	81%	3027	115%	6867	121%	15514	102%
Tg4-42 <sup>het</sup> SH	6065	88%	2456	93%	6203	109%	14343	94%
Tg4-42 <sup>het</sup> EE	5463	79%	1948	74%	4623	81%	12033	79%
5xFAD SH	4104	59%	1265	48%	5278	93%	10894	72%
5xFAD EE	3380	49%	1088	41%	4236	74%	8704	57%

### 3.2.2 Verlust von Calretinin-positiven Zellen im CA1 in der 5xFAD-Mauslinie

Sichtbar wurde, dass die 5xFAD-Mäuse im CA1, verglichen zu den WT- und den Tg4-42-Mäusen einen signifikanten Verlust in der Anzahl der CR-bindenden Zellen zeigen. In den anderen beiden Bereichen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

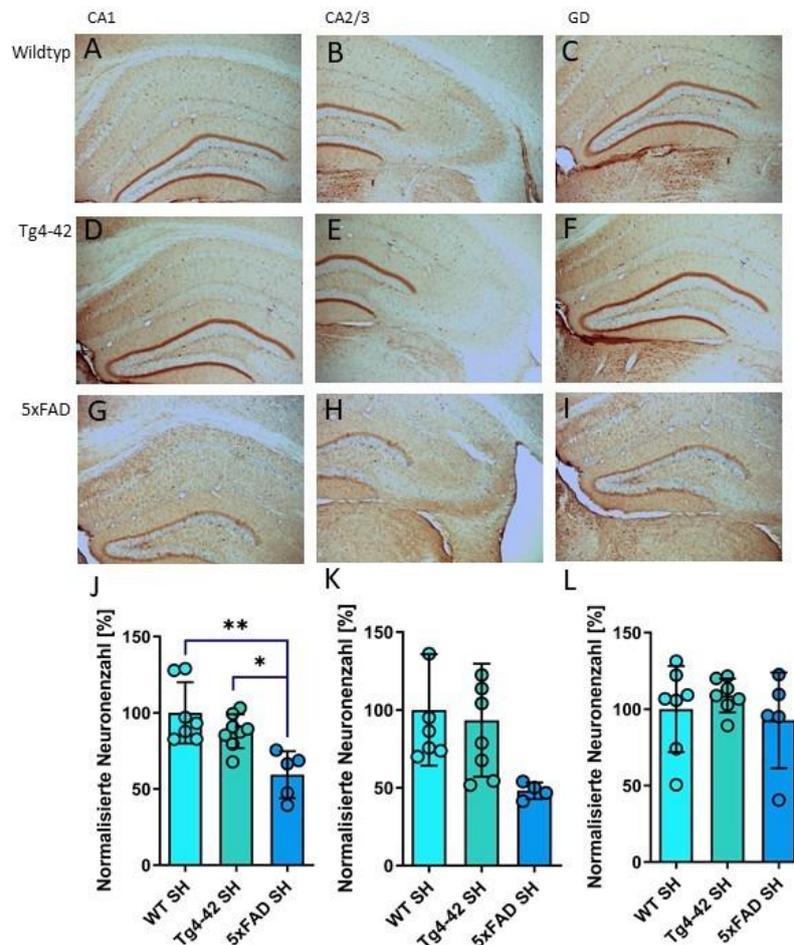


Abbildung 11: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen. Schnitte von WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen wurden mit einem CR-Antikörper und einer DAB-Free Floating Färbung gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbten Neurone mithilfe eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Im CA1 (G) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen WT- bzw. Tg4-42- zu den 5xFAD-Mäusen deutlich. Die CR-positive Zellzahl der 5xFAD-Mäuse ist im Mittel bis zu 40 % geringer als die der anderen Linien. Die Zellzahl der Tg4-42- und 5xFAD-Mäuse wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Tiere (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .  $n = 5-8$  pro Gruppe.

### 3.2.3 Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Anzahl Calretinin-positiver Zellen

#### 3.2.3.1 Keine signifikanten Unterschiede der Calretinin-positiven Zellen in WT-Tieren unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der CR-bindenden Zellen unter SH und EE wurden die Schnitte gefärbt, quantifiziert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den unter SH-Bedingungen gehaltenen WT-Mäusen zu den unter EE-Bedingungen gehaltenen WT-Mäusen.

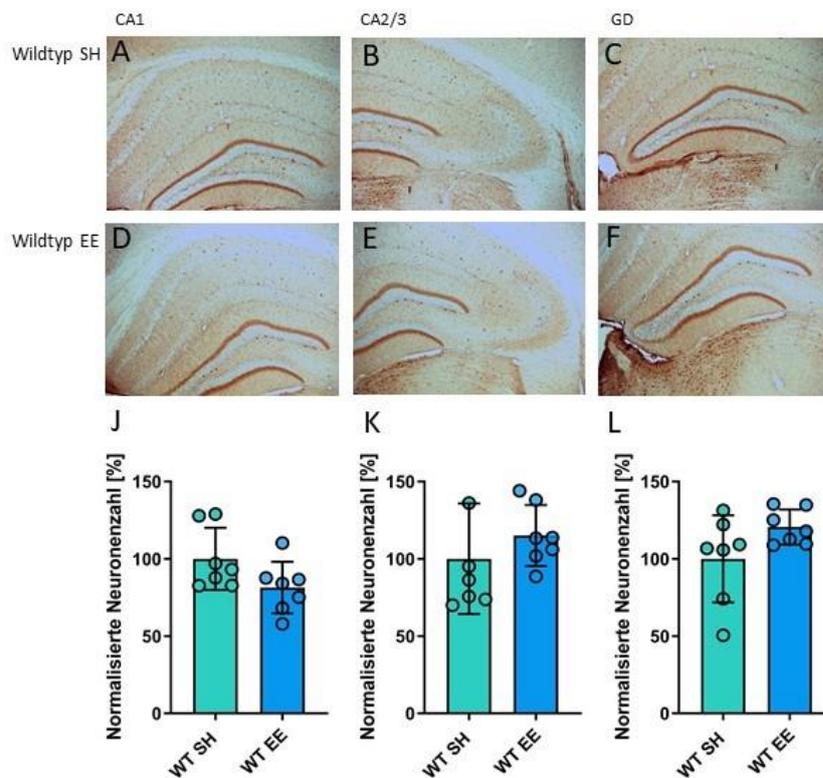


Abbildung 12: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von WT-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von WT-Mäusen wurden mit einem CR-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbten Neurone mithilfe eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Neuronen Zahlen im SH im Vergleich zum EE in den WT-Mäusen beobachtet werden. Die Neuronen Zahl der WT-Mäuse unter EE-Bedingungen wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Mäuse unter SH Bedingungen (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n = 7$  pro Gruppe.

#### 3.2.3.2 Verlust Calretinin-positiver Zellen in Tg4-42-Tieren unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der Anzahl der CR-bindenden Zellen zwischen SH-Bedingungen und EE-Bedingungen wurden die Schnitte der Tg4-42-Mäuse gefärbt, quantifiziert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests ergaben einen

signifikanten Verlust der CR-positiven Zellen der unter EE-Bedingungen gehaltenen Tg4-42-Mäuse im GD.

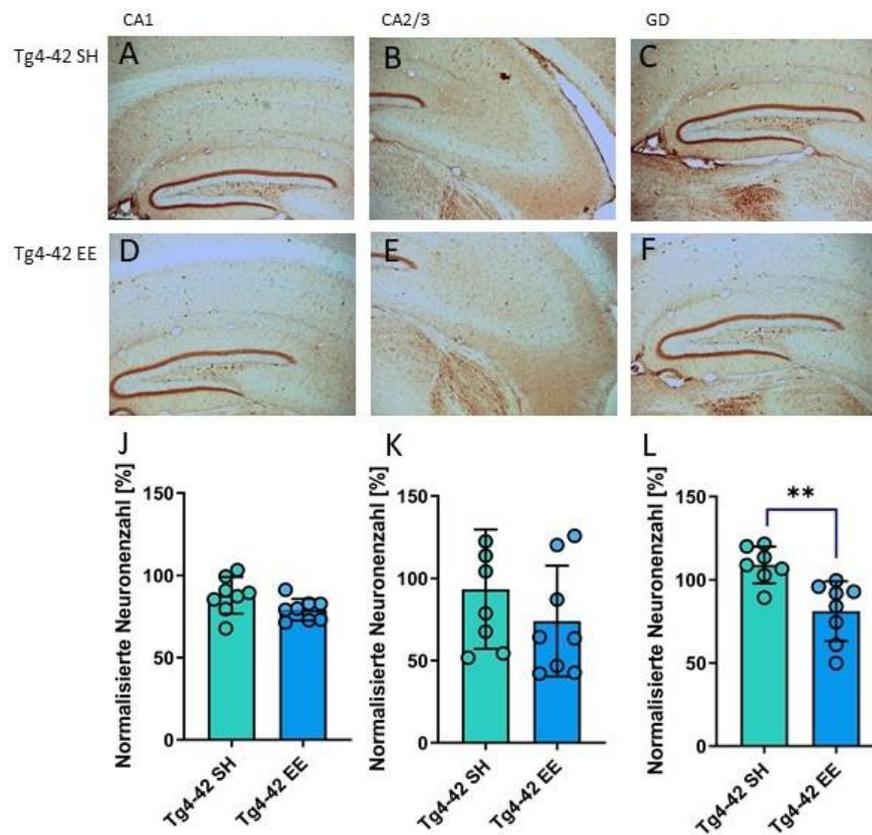


Abbildung 13: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von Tg4-42-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von Tg4-42-Mäusen wurden mit einem CR-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die angefärbten Neurone mittels eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Im GD (L) konnte ein signifikanter Verlust der CR-positiven Zellzahl unter SH-Bedingungen im Vergleich zu EE-Bedingungen in den WT-Mäusen beobachtet werden. Die Neuronen Zahl der Tg4-42-Mäuse unter EE-Bedingungen wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Mäuse unter SH-Bedingungen (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \*\*p < 0,01. n = 8 pro Gruppe.

### 3.2.3.3 Keine signifikanten Unterschiede der Calretinin-positiven Zellanzahl in 5xFAD-Tieren unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der CR-bindenden Zellen der 5xFAD-Mäuse unter SH-Bedingungen und EE-Bedingungen wurden die Schnitte der 5xFAD-Mäuse gefärbt, quantifiziert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied in allen Bereichen des Hippocampus zwischen den WT-Mäusen unter EE-Bedingungen im Vergleich zu SH-Bedingungen.

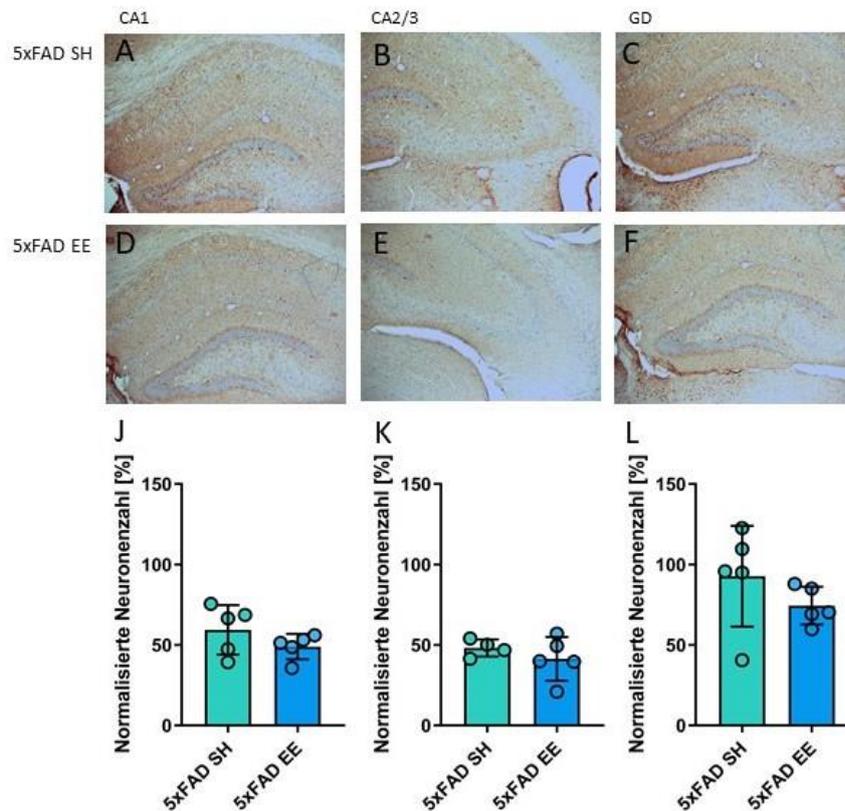


Abbildung 14: Analyse der Calretinin-positiven Zellen im Hippocampus von 5xFAD-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von 5xFAD-Mäusen wurden mit einem CR-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die angefärbten Zellen mittels eines Meanderscans gezählt wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Zellzahlen der 5xFAD-Mäuse unter SH-Bedingungen im Vergleich zu EE-Bedingungen beobachtet werden. Die Zellzahl der 5xFAD-Mäuse unter EE-Bedingungen wurde für die Analyse in Bezug auf die 5xFAD-Mäuse unter SH-Bedingungen (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n = 5 pro Gruppe.

### 3.3 Calbindin

#### 3.3.1 Analyse der Calbindin-positiven Fläche in den WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mauslinien

Zur vergleichenden Untersuchung der CB-bindenden Zellen wurden die Präparate wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben mit einem CB-Antikörper angefärbt, um eine Analyse der gefärbten Flächenanteile mittels *ImageJ* durchzuführen (siehe Kapitel 2.6.3). Anschließend wurden die Messwerte der verschiedenen Mauslinien WT, Tg4-42 und 5xFAD statistisch mittels *Graph Pad Prism* analysiert (siehe Kapitel 2.6.4). Die quantitative Auswertung zeigte in der 5xFAD-Mauslinie einen starken Verlust der CB-bindenden Zellen.

Tabelle 6: Ergebnisse der Quantifizierung der Calbindin-positiver Flächen. Gefärbt wurden Schnitte von WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen mit einem CB-Antikörper. Mittels dem Programm *ImageJ* wurde die Intensität der Färbung drei verschiedener Bereiche analysiert: CA1, CA2/3 und GD. In der Tabelle sind die Intensitäten der Flächen in % und die auf die WT SH normalisierten Intensitäten in % dargestellt.

Calbindin	CA1	CA1 Norm.	CA2/3	CA2/3 Norm.	GD	GD Norm.	Gesamt	Gesamt Norm.
WT SH	28%	100%	16%	100%	66%	100%	34%	100%
WT EE	16%	58%	16%	101%	42%	63%	23%	66%
Tg4-42 SH	32%	116%	18%	117%	68%	102%	38%	110%
Tg4-42 EE	20%	72%	14%	87%	47%	71%	27%	79%
5xFAD SH	9%	32%	3%	21%	9%	14%	7%	21%
5xFAD EE	6%	22%	6%	37%	24%	36%	11%	32%

### 3.3.2 Verlust von Calbindin-positiver Fläche im Hippocampus in der 5xFAD-Mauslinie

In der Auswertung der Calbindin-bindenden Zellen wurde sichtbar, dass die 5xFAD-Mauslinie in allen drei analysierten Bereichen des Hippocampus (CA1, CA2/3 und GD) einen signifikanten Verlust im Flächenanteil der CB-bindenden Zellen zeigten.

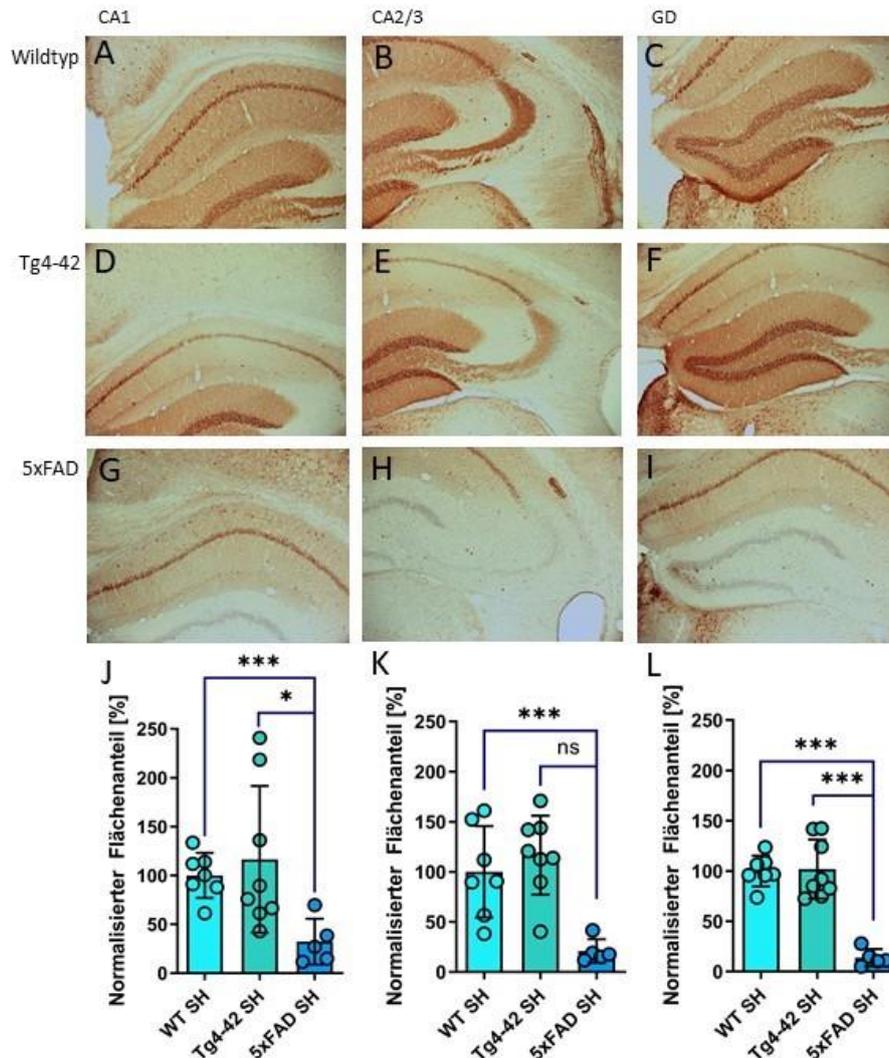


Abbildung 15: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen. A) – I) Immunhistochemische DAB-Färbung mit dem primären Antikörper CB. Der Hippocampus wurde in drei Bereiche eingeteilt, die separat voneinander analysiert wurden: CA1, CA2/3 und GD. Analysiert wurden WT- (n = 7), Tg4-42- (n = 8) und 5xFAD-Mäuse (n = 5). J-L) In allen drei Bereichen zeigte sich ein signifikanter Unterschied (\*\*\*) in dem gefärbten Flächenanteil mit CB der 5xFAD-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen. Der Flächenanteil der Tg4-42- und 5xFAD-Mäuse wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Mäuse (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001. n = 5-8 pro Gruppe.

### 3.3.3 Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Immunreaktion Calbindin-positiver Fläche

#### 3.3.3.1 Verlust von Calbindin-positiver Fläche in der WT-Mauslinie unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der Calbindin-positiven Fläche zwischen SH-Bedingungen und EE-Bedingungen wurden die Schnitte mit einem CB-Antikörper angefärbt. Der Flächenanteil der angefärbten Zellen wurde mit dem Programm *ImageJ* analysiert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den unter SH-Bedingungen gehaltenen WT-Mäusen im Vergleich zu den unter EE-Bedingungen gehaltenen Mäusen im CA1- und GD-Bereich (\*\* $p < 0,01$ ).

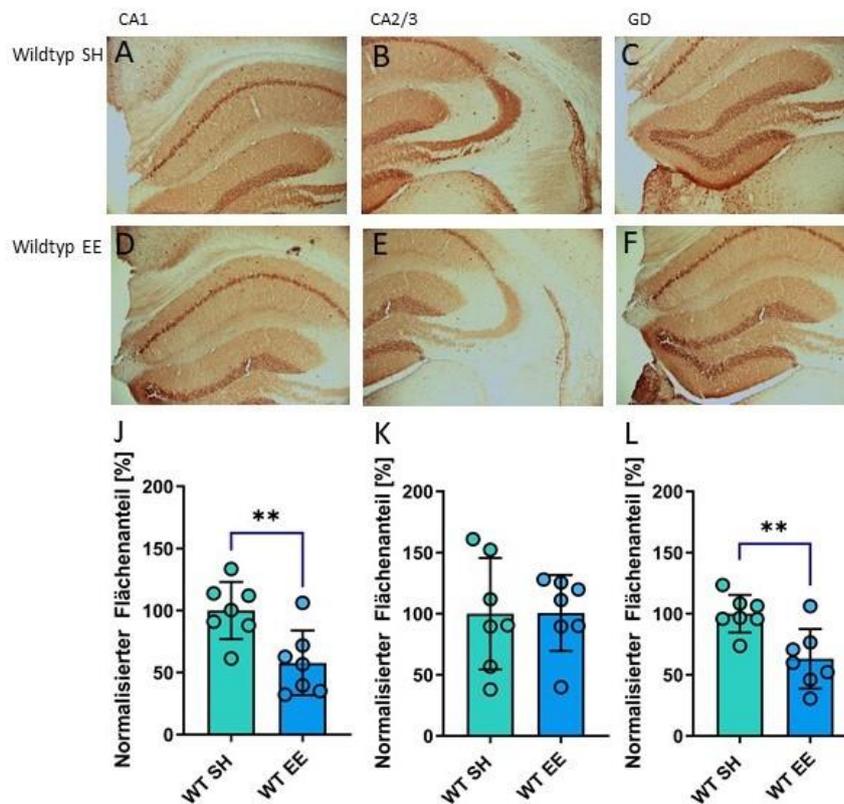


Abbildung 16: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von WT-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von WT-Mäusen wurden mit einem CB-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbte Fläche mittels *ImageJ* analysiert wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Es konnte ein signifikanter Unterschied der Intensität der angefärbten Flächen unter SH-Bedingungen im Vergleich zu EE-Bedingungen im CA1 (J) und GD (L) beobachtet werden. Die angefärbte Fläche der WT-Mäuse im EE wurde für die Analyse in Bezug auf die WT-Mäuse im SH (100%) normalisiert. Die

Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test:  $**p < 0,01$ .  $n = 7$  pro Gruppe.

### 3.3.3.2 Keine signifikanten Unterschiede in der Tg4-42-Mauslinie unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der CB-positiven Fläche in Tg4-42-Mäusen zwischen SH-Bedingungen und EE-Bedingungen wurden die Schnitte der Tg4-42-Mäuse mit einem CB-Antikörper gefärbt, der Flächenanteil mit dem Programm *ImageJ* quantifiziert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests ergaben keinen Unterschied zwischen den unter SH-Bedingungen gehaltenen Mäusen im Vergleich zu den unter EE-Bedingungen gehaltenen Mäusen.

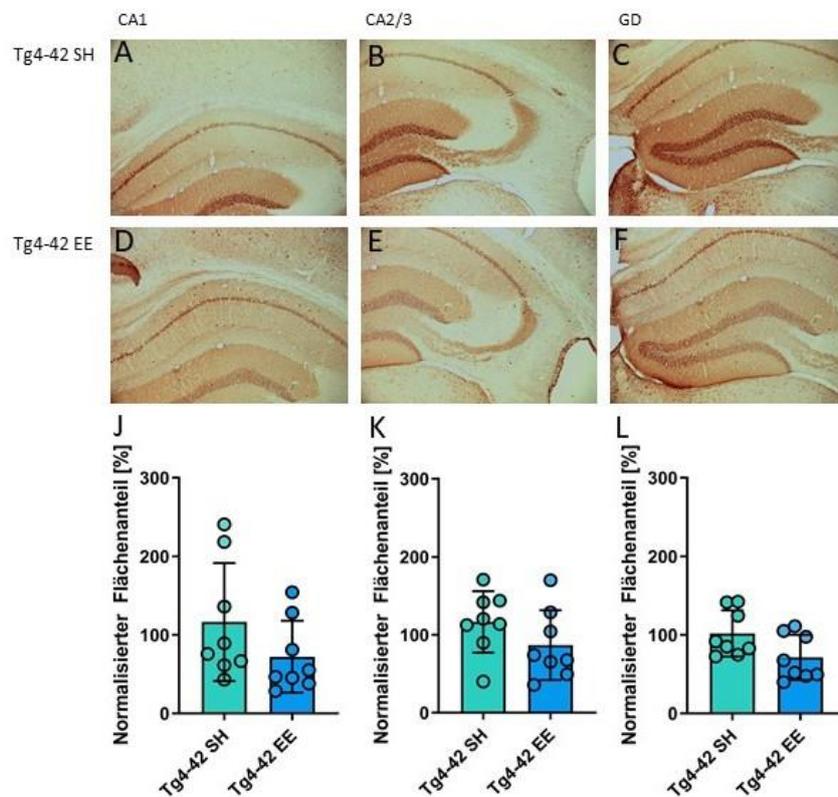


Abbildung 17: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von Tg4-42-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von Tg4-42-Mäusen wurden mit einem CB-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbten Neurone mittels *ImageJ* analysiert wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Immunreaktivität der angefärbten Flächen unter SH-Bedingungen im Vergleich zu EE-Bedingungen beobachtet werden. Die Immunreaktivität der Tg4-42-Mäuse im EE wurde für die Analyse in Bezug auf die der Tg4-42-Mäuse im SH (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.  $n = 7$  pro Gruppe.

### 3.3.3.3 Keine signifikanten Ergebnisse der Calbindin-positiven Fläche in der 5xFAD-Mauslinie unter EE-Bedingungen

Zum Vergleich der CB-bindenden Fläche der 5xFAD-Mäuse zwischen SH-Bedingungen und EE-Bedingungen wurden die Schnitte der 5xFAD-Mäuse mit einem CB-Antikörper gefärbt, der Flächenanteil mit dem Programm *ImageJ* quantifiziert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied in allen Bereichen des Hippocampus zwischen den unter SH-Bedingungen gehaltenen WT-Mäusen und den unter EE-Bedingungen gehaltenen Tieren.

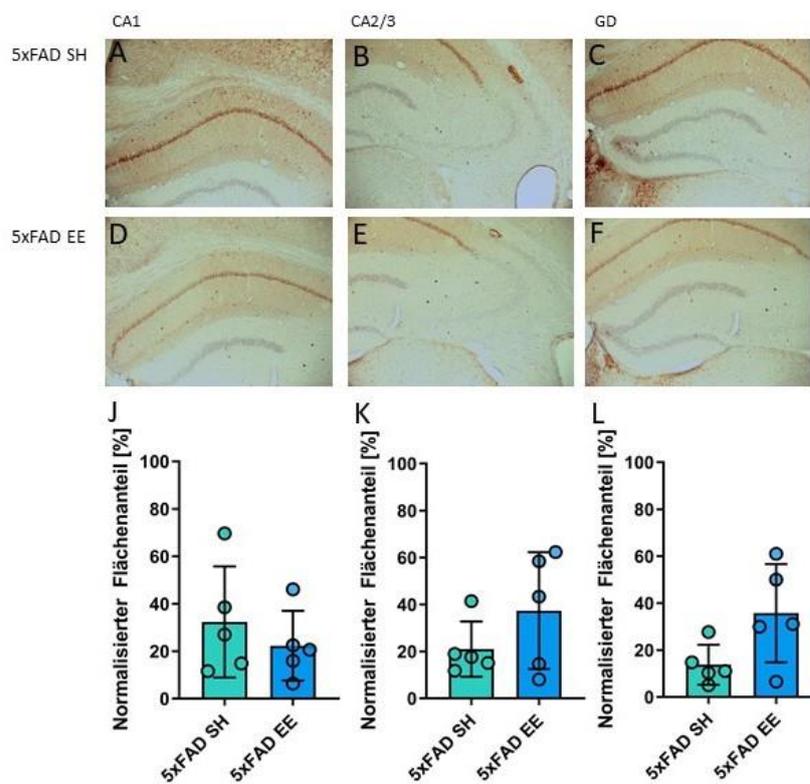


Abbildung 18: Analyse der Calbindin-positiven Fläche im Hippocampus von 5xFAD-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von 5xFAD-Mäusen wurden mit einem CB-Antikörper gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die gefärbte Fläche mittels *ImageJ* analysiert wurden: (A)-(G) CA1, (B)-(H) CA2/3 und (C)-(I) GD. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Intensität der angefärbten Flächen unter SH-Bedingungen im Vergleich zu EE-Bedingungen beobachtet werden. Die Neuronen Zahl der 5xFAD-Mäuse unter EE-Bedingungen wurde für die Analyse in Bezug auf die 5xFAD-Mäuse unter SH-Bedingungen (100%) normalisiert. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. n = 5 pro Gruppe.

### 3.4 Amyloid-Plaques

#### 3.4.1 Analyse der Amyloid-Pathologie in der 5xFAD-Mauslinie

Die 5xFAD-Mauslinie exprimiert als pathologisches Korrelat zum Morbus Alzheimer pathologisches A $\beta$ , welches sich extrazellulär in Amyloid-Plaques im neuronalen Gewebe ablagert (siehe Kapitel 1.1.3 und Kapitel 2.2.3). Für die Analyse der Amyloid-Pathologie in der 5xFAD-Mauslinie wurden Paraffin Schnitte der 5xFAD-Mäuse mit dem Antikörper 4G8 (A $\beta$ ) gefärbt (siehe Kapitel 2.4.2). Daraufhin wurden mittels des Programmes *ImageJ* die Flächenanteile der 4G8 (A $\beta$ ) positiven Amyloid-Plaques bestimmt (siehe Kapitel 2.6.3). Die statistische Analyse wurde mit dem Programm *Graph Pad Prism* durchgeführt (siehe Kapitel 2.6.4).

Tabelle 7: Ergebnisse der Quantifizierung der Amyloid-Plaques in der 5xFAD-Mauslinie. Gefärbt wurden Paraffin Schnitte von 5xFAD-Mäusen mit dem Antikörper 4G8 (A $\beta$ ). Mittels *ImageJ* wurde der Anteil der Amyloid-Plaques in drei verschiedenen Bereichen analysiert: CA1, CA2/3 und GD. In der Tabelle sind die analysierten Intensitäten der 4G8 (A $\beta$ ) positiven Flächen von 5xFAD-Mäusen unter SH-Bedingungen in % und die von 5xFAD-Mäusen unter EE-Bedingungen in % aufgeführt.

Flächenanteil Amyloid-Plaques	CA1 SH	CA1 EE	CA2/3 SH	CA2/3 EE	GD SH	GD EE	Gesamt SH	Gesamt EE
5xFAD Tier 1	9%	14%	5%	5%	9%	9%	12%	14%
5xFAD Tier 2	7%	12%	6%	5%	11%	11%	14%	13%
5xFAD Tier 3	10%	12%	7%	4%	17%	12%	16%	15%
5xFAD Tier 4	8%	12%	7%	4%	10%	8%	12%	11%
5xFAD Tier 5	8%	13%	7%	8%	10%	11%	16%	14%
Mittelwert	8%	12%	7%	5%	11%	10%	14%	13%

#### 3.4.2 Flächenanteil der Amyloid-Plaques am höchsten im Gyrus Dentatus

Sichtbar wurde, dass die 5xFAD-Mäuse im GD verglichen zu den Bereichen CA1, CA2/3 einen signifikant höheren Flächenanteil der 4G8(A $\beta$ )-positiven Amyloid-Plaques zeigten.

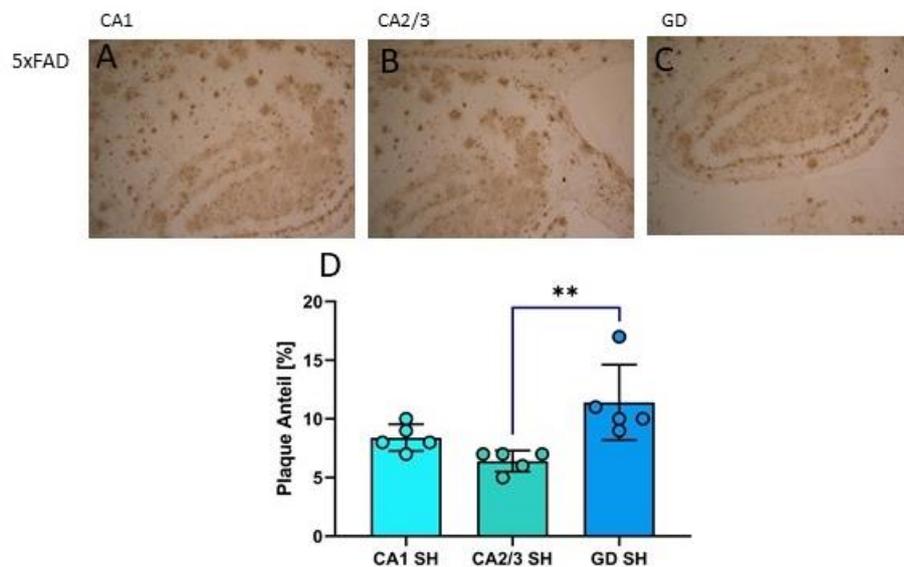


Abbildung 19: Analyse der Flächenanteile der Amyloid-Plaques in 5xFAD-Mäusen A) – C) Immunhistochemische DAB-Färbung mit dem Amyloid-Plaques anfärbenden Antikörper 4G8 (A $\beta$ ). Der Hippocampus wurde in drei Bereiche eingeteilt, die separat voneinander analysiert wurden: CA1, CA2/3 und GD. Analysiert wurden Mäuse der 5xFAD-Mauslinie. A-C) Im GD ist der Plaque-Anteil mit 11% am höchsten. Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \*\* $p < 0,01$ .  $n = 5$  pro Gruppe.

### 3.4.3 Der Effekt von EE-Bedingungen auf die Amyloid-Plauepathologie

Zum Vergleich der Flächenanteile der Amyloid-Plaques der 5xFAD-Mäuse unter SH-Bedingungen zu denen unter EE-Bedingungen wurden die Schnitte der 5xFAD-Mäuse mit dem A $\beta$  anfärbenden Antikörper 4G8 (A $\beta$ ) gefärbt, der Flächenanteil mit dem Programm *ImageJ* quantifiziert und mittels *Graph Pad Prism* statistisch analysiert. Diese t-Tests zeigten den einen höheren Amyloid-Plaueanteil im CA1-Bereich des Hippocampus der 5xFAD-Mäuse unter EE-Bedingungen im Vergleich zu denen unter SH-Bedingungen.

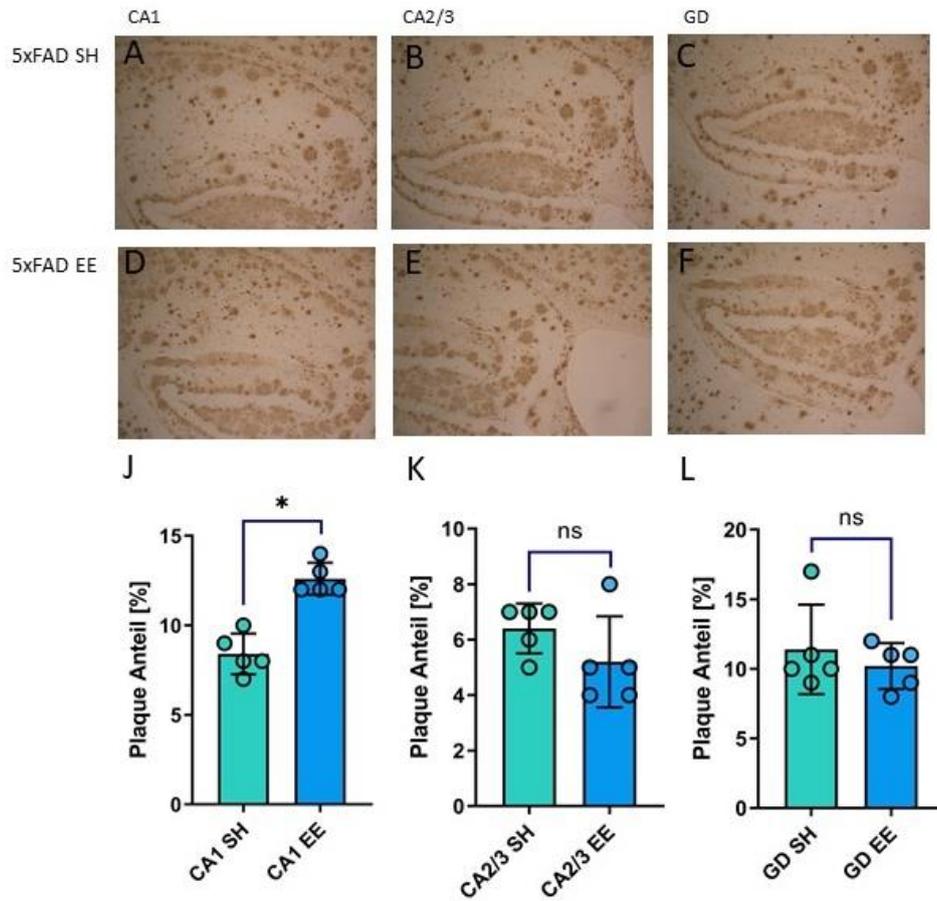


Abbildung 20: Analyse der Flächenanteile der Amyloid-Plaques im Hippocampus von 5xFAD-Mäusen unter SH-Bedingungen verglichen mit EE-Bedingungen. Schnitte von 5xFAD Mäusen wurden mit dem Antikörper 4G8 (A $\beta$ ) gefärbt. Der Hippocampus wurde für die Analyse in drei Bereiche eingeteilt, in denen die Plaque-Pathologie mittels *ImageJ* analysiert wurden: (A)-(J) CA1, (B)-(K) CA2/3 und (C)-(L) GD. Es konnte ein signifikanter Unterschied der Flächenanteile im SH zum EE im CA1-Bereich beobachtet werden (\*p < 0,05). Die Graphen zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Ungepaarter t-test: \*p < 0,05. n = 5 pro Gruppe.

### 3.4.4 Korrelation der Interneuron-Verluste mit dem Amyloid-Plaque-Anteil

Um eine mögliche Korrelation zwischen den Interneuron-Verlusten und dem Amyloid-Plaque-Anteil darzustellen wurden Korrelationsrechnungen in den verschiedenen Arealen des Hippocampus durchgeführt. Statistisch wurden dabei die Korrelationen nach Pearson oder nach Spearman mithilfe des Programmes *Graph Pad Prism* durchgeführt.

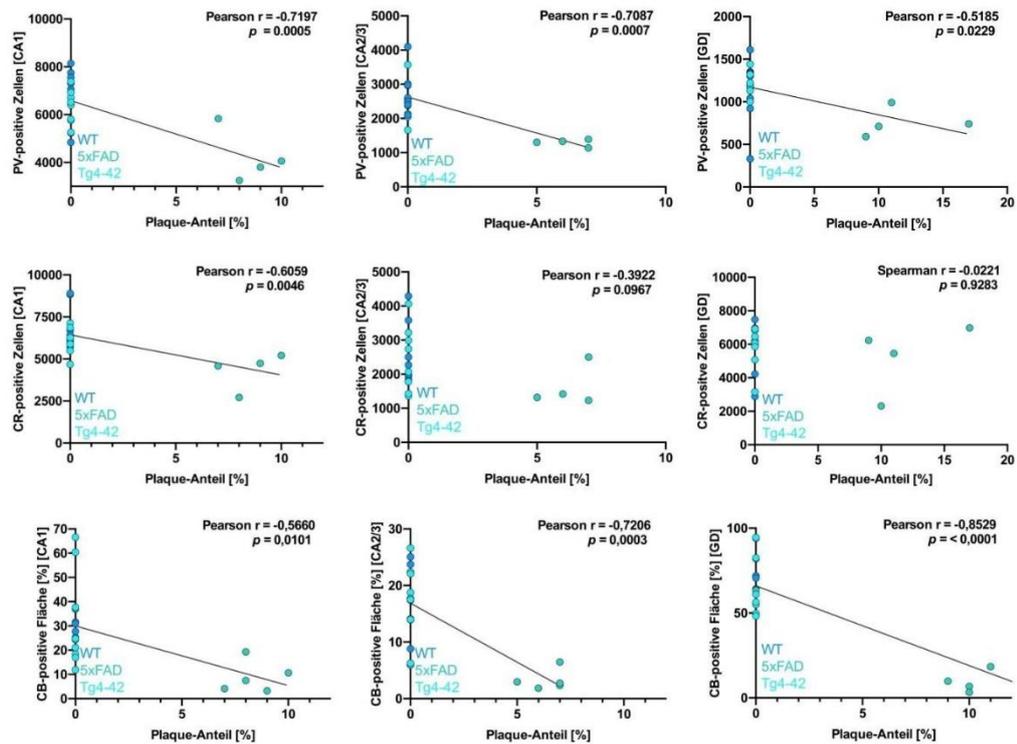


Abbildung 21: Korrelationen der PV-, CR- und CB-positiven Zahlen unter SH-Bedingungen mit dem Plaque Anteil der Mauslinien WT, Tg4-42 und 5xFAD. Im CA1 kann in der 5xFAD-Mauslinie ein negativer linearer Zusammenhang der Interneuronen-Zahl zu dem Plaque Anteil dargestellt werden. Auch im CA2/3- und GD-Areal besteht eine negative Korrelation der PV- und CB-positiven Zellzahlen in der 5xFAD-Mauslinie zum Plaque Anteil.

## 4 Diskussion

### 4.1 Calcium-bindende Proteine und ihre Bedeutung für die Zelle im Rahmen einer Alzheimer Erkrankung

Das Augenmerk der aktuellen Alzheimer Forschung liegt derzeit nicht mehr nur auf den klassischen Hypothesen, wie die Amyloid-Hypothese oder die Tau-Hypothese, sondern vermehrt auf anderen Pathologien, wie die Inflammation oder auch der Neuronenverlust. Dieser Neuronenverlust scheint aber in der Tier-Forschung schwieriger nachzuvollziehen zu sein. Eine aktuelle Studie beschäftigte sich ausführlich mit dem Neuronenverlust der unterschiedlichen Alzheimer-Mausmodellen und verglichen diese miteinander (Wirths und Zampar 2020). In den beiden hier untersuchten Tiermodellen wurde in dieser Arbeit eine unterschiedliche Ausprägung der Neuronenverluste festgestellt.

Das weit verbreitete 5xFAD-Mausmodell ist eine transgene Linie, in der der Neuronenverluste quantitativ erfasst wurde. Interessanterweise gehen intraneuronale A $\beta$ -Akkumulationen auch bei 5xFAD-Mäusen der extrazellulären Plaque-Ablagerung voraus. Diese Mäuse zeigen einen frühen Beginn der Amyloid-Plaque-Ablagerung und weisen einen Neuronenverlust in der kortikalen Schicht V und im Subiculum auf (Oakley et al. 2006). Stereologische Quantifizierungen bestätigten einen signifikanten Verlust von kortikalen Neuronen der Schicht V im Alter von neun und zwölf Monaten (Jawhar et al. 2012). Im Alter von zwölf Monaten wurde keine Reduktion der Neuronenanzahl in der CA1-Schicht festgestellt, die trotz erheblicher APP-Expression keine intraneuronale A $\beta$ -Immunreaktivität aufweist. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beleg für die Annahme, dass die intrazelluläre Lokalisation des Amyloid-Peptids eng mit der Neurotoxizität verbunden ist (Jawhar et al. 2012). Es muss jedoch angemerkt werden, dass in einer anderen Studie ein Verlust von Pyramidenneuronen im Ammonshorn des Hippocampus berichtet wurde, der nach Deletion von endogenem murinem Tau gerettet werden konnte (Leroy et al. 2012).

Das transgene Mausmodell-Tg4-42, welches A $\beta$ 4-42 unter der Kontrolle des neurosenspezifischen Thy1-Promotors exprimiert, wurde als Werkzeug zur Beurteilung der In-vivo-Toxizität dieses Peptids entwickelt. In guter Übereinstimmung mit anderen Maus-Modellen, die nur spezifische A $\beta$ -Peptidvarianten exprimieren, entwickeln diese Mäuse keine extrazelluläre Amyloid-Pathologie (Bouter et al. 2013), sondern eine robuste intraneuronale A $\beta$ -Akkumulation, hauptsächlich im

Hippocampus. Sie entwickeln Defizite im räumlichen Bezug und im Objekterkennungsgedächtnis, die mit einem robusten Neuronenverlust in der CA1-Pyramiden-schicht in einer Gendosis-abhängigen Weise korrelieren (Antonios et al. 2013; Bouter et al. 2013; Hüttenrauch et al. 2016b), sowie motorische Defizite (Wagner et al. 2019) und eine reduzierte Neurogenese (Gerberding et al. 2019).

Somit blieb die Frage offen, wie sich die anderen Zellpopulationen in diesen Mausmodellen verhalten. Um die Interneuronen zu untersuchen, wurden diese mit Antikörpern gegen die von ihnen exprimierten Calcium-bindenden Proteine markiert. Die für diese Arbeit untersuchten Calcium-bindenden Proteine PV, CR und CB sind als Calcium-Puffer für das Gleichgewicht des Neuronalen Netzwerkes wichtig (Heizmann 1992; Gall et al. 2003). Der Verlust der Calcium-bindenden Proteine bzw. der Interneuronen, die diese enthalten und für deren Aufgabe die Aufrechterhaltung des Calciumspiegels eine wesentliche Rolle spielt, könnte eine wichtige pathologische Veränderung des Morbus Alzheimer darstellen. Am Anfang dieser Arbeit stand also die Frage, inwiefern Veränderungen dieser GABAergen Interneuronen bzw. der untersuchten Calcium-bindenden Proteinen in den Mausmodellen Tg4-42 und 5xFAD zu neuropathologischen Veränderungen führen.

Die PV-bindenden Zellen gehören zu der Gruppe der GABAergen Interneuronen im Hippocampus (Baimbridge et al. 1992; Klausberger 2009). Bei der Quantifizierung mit dem Antikörper PV angefärbten Interneuronen zeigte sich in den Ergebnissen dieser Arbeit ein ausgeprägter Verlust dieser Zellpopulation in der 5xFAD-Mauslinie. In allen analysierten Arealen des Hippocampus (CA1, CA2/3 und GD) konnte ein signifikanter Verlust der PV-positiven Zellen in der 5xFAD-Mauslinie beobachtet werden. Die Beobachtung deckt sich mit einigen früher publizierten Untersuchungen anderer Mauslinien oder auch der Ratte (Huh et al. 2016). Eine transgene Mauslinie, die ebenfalls durch eine starke Amyloidose gekennzeichnet ist, wurde auch im Hinblick auf die Anzahl PV-positiver Zellen untersucht: In homozygoten APP/PS1 $\Delta$ Ex9-Mäusen wurden altersabhängig verminderte Zahlen von CR-, PV-, Somatostatin- oder CB-positiven Interneuronen in den piriformen und lateralen entorhinalen Kortex beschrieben (Saiz-Sanchez et al. 2012). APP695swe/PS1A246E-Mäuse zeigten im Alter von 14 Monaten einen signifikanten Verlust von sowohl CR- als auch PV-positiven Zellen im DG, wobei die Reduktion in der polymorphen Schicht am deutlichsten war (Popović et al. 2008). Bei 6 Monate alten TgCRND8-Mäusen wurden PV-positive Zellen quantifiziert, wobei PV-Neuronen nur im Stratum oriens der CA3-Region signifikant reduziert waren (Albuquerque et al. 2015). Andererseits wurden signifikante Reduktionen der PV-positiven Zellen in der CA1/2-Schicht und im Subiculum in der gleichen Mauslinie bereits im Alter von 1 Monat berichtet, einem Zeitpunkt vor der Ablagerung von A $\beta$ -Peptiden in Form von Amyloid-Plaques

(Mahar et al. 2016). 3xTg-Mäuse im Alter von 18 Monaten zeigten eine Abnahme der CR- und PV-positiven Zellen in der CA1-Schicht von ~33 % bzw. ~52 % (Zallo et al. 2018), was in etwa der Größenordnung entspricht, die in der aktuellen Studie beobachtet wurde (~40 % sowohl für CR als auch PV in der CA1). Auch in anderen Hirnregionen von 5xFAD-Mäusen wie z. B. in der kortikalen Schicht IV oder auch in tiefen Schichten des cingulären und sekundären motorischen Kortex konnte ein signifikanter Verlust der PV-bindenden Zellen festgestellt werden (Flanigan et al. 2014; Ali et al. 2019). Neuroimaging-Studien lieferten Hinweise auf eine ~10%ige Abnahme des Hippocampus-Volumens bei 5xFAD-Mäusen im Vergleich zu WT im Alter von 13 Monaten (Macdonald et al., 2014). Die beobachtete Reduktion der CR- und PV-positiven Neuronenanzahl von ~30 % für CR- und mehr als 40 % für PV-positive Zellen legt jedoch nahe, dass der Volumenverlust allein nicht ausreicht, um diese Beobachtung zu erklären. In gealterten APP/PS1KI-Mäusen (Takahashi et al. 2010), einem aggressiven Modell, das nachweislich einen ~50%igen Verlust von CA1-Neuronen und eine robuste Amyloid-Plaque-Pathologie in Hirnregionen wie Kortex und Hippocampus aufweist, konnte eine signifikante Reduktion von PV- und CR-positiven Neuronen in CA1/2 und DG gezeigt werden (Casas et al. 2004). Interessanterweise wurde im letztgenannten Modell keine Veränderung der PV- und CR-positiven Neuronen in den Schichten V und VI des frontalen Kortex festgestellt, obwohl massive Thioflavin S-positive Amyloid-Ablagerungen vorhanden und pyramidale Neuronen in diesem kortikalen Bereich signifikant reduziert (>30%) waren (Lemmens et al. 2011). In humanen Gehirnen von an Alzheimer erkrankten Menschen zeigte sich ebenfalls ein Verlust PV-positiver Zellen (Arai et al. 1987; Brady und Mufson 1997; Sanchez-Mejias et al. 2020), während in einigen Studien jedoch kein PV-Verlust festgestellt werden konnte (Hof et al. 1991; Leuba et al. 1998). Der starke Verlust der PV-positiven Zellen in der 5xFAD-Mauslinie wirft die Frage auf, welche pathologischen Veränderung in der 5xFAD-Mauslinie für diesen neurodegenerativen Prozess verantwortlich sein kann. In den Gehirnen dieser Tiere findet man extrazelluläre Amyloid-Plaques (siehe Kapitel 1.2.2), die in Verbindung mit dem starken Interneuronenverlust gebracht werden könnten (siehe Kapitel 4.2). Warum nun die Tg4-42-Mauslinie nicht derart von dem Interneuronen-Verlust betroffen ist, obwohl in dieser Mauslinie ein starker allgemeiner Neuronenverlust im Hippocampus und auch starke kognitive Einschränkungen beschrieben wurden (Bouter et al. 2013), wirft weitere Fragen auf. Es könnte also sein, dass die hier untersuchten PV-positiven Interneuronen besonders vulnerabel auf die im 5xFAD-Mausmodell vorhandenen Amyloid-Plaques reagieren. Neuere Daten deuten darauf hin, dass Behandlungsansätze, die darauf abzielen, die Übererregbarkeit von PV-Interneuronen zu verhindern, langfristig positive Auswirkungen auf das Gedächtnis und die Aktivität

des hippocampalen Netzwerks haben und sogar zu einer verringerten Ablagerung von A $\beta$ -Plaques führen könnten (Hijazi et al. 2019).

Die CR-positiven Zellen gehören ebenfalls zur Gruppe der GABAergen Interneuronen im Hippocampus. Sie sollen wichtige inhibitorische Aufgaben übernehmen, um das Gleichgewicht im neuronalen Netzwerk aufrecht zu erhalten und z. B. Lernprozesse zu ermöglichen (Gulyás et al. 1996). In der hier erfolgten Quantifizierung der CR-positiven Zellen zeigt sich wie auch schon bei den PV-positiven Zellen ein Verlust im 5xFAD-Mausmodell, der in der CA1- und CA2/3-Region am stärksten ausgeprägt war. Dies verstärkt die Vermutung, dass der Verlust an Interneuronen, durch die das 5xFAD-Mausmodell definierenden Amyloid-Plaques verursacht worden sein könnte. Auch CR-positive Zellen wurden schon in anderen Mausmodellen, Spezies und Hirnarealen untersucht. Es zeigte sich auch in anderen Mausmodellen, wie z. B. im APP751SL/PS1M146L-Mausmodell ein CR-Verlust im Hippocampus bereits ab einem Alter der Mäuse von 4 Monaten (Baglietto-Vargas et al. 2010). In humanen Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer wurden bisher widersprüchliche Vulnerabilitäten der CR-positiven Zellen berichtet, mit einem Zellverlust im Kortex (Saiz-Sanchez et al. 2015) und keiner Veränderung im Hippocampus (Brion und Résibois 1994).

Als drittes Calcium-bindendes Protein wurde in dieser Arbeit CB betrachtet. Es kommt in GABAergen Interneuronen vor, aber auch in Pyramidenzellen und Körnerzellen des GD (Sloviter et al. 1991; Stefanits et al. 2014). Die 5xFAD Mäuse zeigen einen deutlichen Verlust CB-positiver Zellen in allen Bereichen des Hippocampus. CB wurde in zuvor veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten häufig separat von den anderen Calcium-bindenden Proteinen betrachtet. Es scheint einen besonderen Stellenwert in den neuronalen Aufgaben und bei der Alzheimer Erkrankung einzunehmen. Zuvor wurde gesehen, dass es in dem hAPP-Mausmodell zu einem Verlust des CBs kommen kann (Palop et al. 2003). In menschlichen Gehirnen von Alzheimer Patienten konnte ein Verlust CB-bindender Zellen im Hippocampus beobachtet werden (Iacopino und Christakos 1990; Geula et al. 2003).

## 4.2 Der Einfluss der Amyloid-Pathologie auf die Zahl der Interneuronen

Da vor allem der starke Verlust aller drei untersuchten Calcium-bindenden Proteine in der 5xFAD-Mauslinie auffiel, wurde in dieser Arbeit das Ausmaß der Amyloid-Pathologie in den Gehirnen derselben Tiere untersucht, um einen Zusammenhang zwischen den Plaques und dem Interneuronenverlust zu objektivieren. Eine Assoziation von Neuronenverlust und Amyloid-Plaques wurde schon vermehrt beschrieben (Moreno-Gonzalez et al. 2009; Wirths und Zampar 2020). Auch in dieser Arbeit wurde die Amyloid-Belastung in den drei definierten Bereichen CA1, CA2/3 und GD quantifiziert (siehe Kapitel 3.4). In allen drei definierten Regionen ist im 5xFAD-Mausmodell im Alter von 12 Monaten eine ausgeprägte Amyloidose zu finden. Gemessen an der relativen Fläche scheint diese im GD am deutlichsten ausgeprägt, gefolgt von CA1 und der CA2/3-Region. Die PV-bindenden Zellen zeigten ebenfalls einen starken Verlust im GD, was die Vermutung nahelegte, dass diese Zellen sehr vulnerabel auf das extrazelluläre A $\beta$  reagieren. Im Gegensatz dazu war der Verlust der CR-bindenden Zellen in CA1 am höchsten und im GD nicht signifikant. Auch die CB-bindenden Zellen zeigten ein anderes Verteilungsmuster und waren in allen drei Bereichen stark reduziert. Eventuell reichen schon wenige Plaques aus, um in allen Bereichen zu einem starken Verlust des Calcium-bindenden Proteins CB zu führen. Der beobachtete Interneuronenverlust in der 5xFAD-Mauslinie und die dargestellte Korrelation zwischen Interneuronenverlusts und Amyloid-Belastung (siehe Kapitel 3.4.4) unterstützt also frühere Beobachtungen, die den Verlust von CR-Interneuronen mit dem Auftreten von extrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen und der Bildung von dystrophischen Neuriten in Verbindung brachten (Baglietto-Vargas et al., 2010). Auch in A $\beta$ PP/PS1-Mäusen wurde eine Korrelation zwischen dem CR-Verlust (Saiz-Sanchez et al. 2012) sowie dem CB-Verlust (Popović et al. 2008) und dem steigenden Plaque-Load beobachtet. Und auch für CB-positive Zellen konnte der Verlust mit den Amyloid-Plaques in Verbindung gebracht werden (Palop et al. 2003).

### 4.3 Der Einfluss der EE-Bedingungen auf die Zahl der Interneuronen

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der EE-Bedingungen auf die Ausprägung des Interneuronen-Verlusts der verschiedenen Mauslinien untersucht. Das EE soll mit seiner reizangereicherten Ausstattung eine menschliche Umgebung mit vermehrter Bewegung und stimulierenden Erlebnissen simulieren (siehe Kapitel 1.4).

In der WT-Mauslinie zeigt sich ein signifikanter Anstieg der PV-positiven Zellzahl in CA2/3 unter EE-Bedingungen. Die CR-positiven Zellen sind unter den EE-Bedingungen nicht verändert. Es zeigt sich aber ein Verlust CB-positiver Immun-Reaktivität in den Bereichen CA1 und GD. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die PV-positiven Zellen im Gesunden von vermehrter Bewegung und kognitiver Stimulation profitieren. Die CB-positiven Zellen scheinen von den EE-Bedingungen nicht zu profitieren und sind eventuell vulnerabel auf oxidativen Stress. In einer früheren Arbeit, in der die Neuronenzahl im CA1-Band und das Verhalten 12-monatiger WT-Tiere untersucht wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den WT-SH und WT-EE Tieren (Hüttenrauch et al. 2016a).

In der Tg4-42-Mauslinie sind im CA1-Bereich unter EE-Bedingungen signifikant weniger PV-positive Zellen zu finden. Gleichzeitig fällt ein signifikanter Verlust CR-positiver Zellen im GD auf. Die CB-positiven Zellen zeigen keine signifikanten Veränderungen unter EE-Bedingungen. Dies könnte wiederum ein Hinweis darauf sein, dass die PV-positiven Zellen in diesem Tiermodell nicht vom EE profitieren. In einer früheren Studie zeigte sich in 12-monatigen heterozygoten Tg4-42-Tieren ein deutlicher positiver Effekt auf die Neuronenzahl im CA1-Band und die Gedächtnisleistungen der Tiere unter EE-Bedingungen (Hüttenrauch et al. 2016b). Auch in einer weiteren Studie wurde die Tg4-42-Mauslinie hinsichtlich des Ansprechens auf die EE-Bedingungen untersucht. Hier wurde gezeigt, dass eine viermonatige EE-Umgebung zu einer Verbesserung der Neurogenese im GD bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen führte (Gerberding et al. 2019). Entsprechende Effekte wurde auch in anderen Mauslinien beobachtet, wie z. B. in APP/PS1-Mäusen (Wang et al. 2019). Dass die Resultate dieser Arbeit abweichende Ergebnisse hinsichtlich der EE-Bedingungen in der Tg4-42-Mauslinie erbringen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich die Interneuronen im Stoffwechsel und in der Vulnerabilität sehr von den Neuronen unterscheiden.

Auch in der 5xFAD-Mauslinie zeigte sich kein signifikanter Unterschied der PV-, CR- und CB-positiven Zellzahlen unter EE-Bedingungen. Zur Anzahl von Interneuronen in AD-Mausmodellen im Hinblick auf den Einfluss von EE-Bedingungen gibt es bislang nur wenige Studien. Im Tg2576 Modell konnte gezeigt werden, dass sich ein Verlust an PV-positiven Zellen unter EE-Bedingungen normalisierte (Cattaud et al.

2018). Eine vorangegangene Arbeit zeigte keinen positiven Einfluss der EE-Bedingungen auf z. B. das Ausmaß der Amyloid-Pathologie in der 5xFAD-Mauslinie (Hüttenrauch et al. 2017). Die Resultate dieser Arbeit zeigen keine Veränderung des Plaque-Anteils in CA2/3 oder GD. Im CA1-Bereich ist in der 5xFAD-Mauslinie unter EE-Bedingungen die Anzahl der Amyloid-Plaques gestiegen. Einige Studien berichteten von einer Abnahme der Amyloid-Plaques unter EE-Bedingungen in diversen Alzheimer-Mausmodellen, z. B. in APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9-Mäusen (Hu et al. 2010), Tg2576-Mausmodell (Yuede et al. 2009), APP/PS1-Mausmodell (Ke et al. 2011; Liu et al. 2013; Zhang et al. 2018), APP<sup>swe</sup> X PS1 $\Delta$ E9 (Lazarov et al. 2005), PDGFB-APP<sup>swe</sup>Ind-Mäusen (Balthazar et al. 2018) oder auch in TgCRND8-Mäusen (Adlard et al. 2005). Wenige Studien zeigten aber auch widersprüchliche Ergebnisse mit einer Zunahme der Amyloid-Plaques, z. B. in APP/PS1-Mäusen (Jankowsky et al. 2003). Und in einigen Studien führten die EE-Bedingungen zu keinerlei Veränderungen des Fortschreitens der Amyloid-Ablagerungen, z. B. in APP/PS1KI-Mäusen (Cotel et al. 2012; Stuart et al. 2019), in 3xTg-Mäusen (Marlatt et al. 2013) oder auch im TgCRND8-Mausmodell (Richter et al. 2008). Somit ist bisher weitgehend unklar, ob sich verstärkte Bewegung positiv auf die Ausprägung der Amyloid-Pathologie auswirkt. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind jedoch in erster Linie auch auf eine fehlende Vergleichbarkeit der Studien zurückzuführen, da unterschiedliche transgene Linien, unterschiedliche Altersstufen und voneinander abweichende EE-Bedingungen verwendet wurden.

#### 4.4 Limitationen und methodische Einschränkungen

Eine Limitation dieser Arbeit ist das Fehlen von Längsschnittdaten. Aufgrund des fortgeschrittenen Alters der Mäuse (12 Monate) könnten altersbedingte Veränderungen des Gehirns mit in die Auswertung einfließen. Eine Abgrenzung zwischen Veränderungen aufgrund der Alzheimer-Pathologie und altersbedingten Veränderungen ist nicht möglich. Die relative kleine Stichprobengröße der 5xFAD-Mauslinie erschwert eine eindeutige Korrelation zwischen Interneuronenverlust und Amyloid-Plaque-Belastung. Eine weitere Einschränkung ist das Fehlen von Informationen über Geschlechtsunterschiede, da in der aktuellen Arbeit nur weibliche Mäuse verwendet wurden. Es ist bekannt, dass sowohl 5xFAD-Mäuse auf einem C57Bl6/SJL-Hybrid-Hintergrund (Devi et al. 2010), als auch auf einem kongenen C57Bl/6-Hintergrund, wie er in der aktuellen Arbeit verwendet wurde, Geschlechtsunterschiede mit einer früheren und stärker ausgeprägten Amyloid-Pathologie bei weiblichen Mäusen zeigen (Manji et al. 2019).

Die Färbung mit dem Antikörper CB stellt eine weitere Limitation dieser Arbeit dar. Das Ziel der Quantifizierung der CB-positiven Zellen konnte nicht erreicht werden. Die Färbung war nicht dazu geeignet, eine zielgerichtete Zellzählung durchzuführen, sodass alternativ eine Analyse mit *ImageJ* durchgeführt wurde. Die quantitativen Ergebnisse des Antikörpers CB sind aufgrund der methodischen Unterschiede nicht mit den Ergebnissen der anderen beiden verwendeten Antikörpern vergleichbar.

## 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine signifikante Reduktion der CR-, PV- und CB-positiven Interneuronen-Populationen im Hippocampus von gealterten 5XFAD-, aber nicht Tg4-42-Mäusen beobachtet werden konnte. Obwohl das letztgenannte Modell einen weitreichenden Verlust von CA1-Pyramidenneuronen aufweist, könnte das Fehlen einer offensichtlichen extrazellulären Amyloid-Plaques-Pathologie im Gegensatz zum 5xFAD-Modell den Erhalt dieser wichtigen hippocampalen inhibitorischen Zelltypen erklären. Die Untersuchung der Interneuronen in größeren Stichproben bzw. weiteren Hirnareale in diesen beiden Mausmodellen könnte weitere aufschlussreiche Ergebnisse erbringen.

Die untersuchten EE-Bedingungen zeigten nicht den erwarteten positiven Effekt auf den Interneuronenverlust. Es ist bislang nicht viel darüber bekannt, inwiefern sich vermehrte Bewegung bzw. die EE-Bedingungen auf die Interneuronen-Population auswirken. Auch die genauere Analyse der Funktion der Interneuronen und die Bedeutung des Verlusts könnte noch Inhalt weiterer Untersuchungen werden.

Für das bessere Verständnis und zur besseren Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit könnte eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt werden. Von Interesse wäre, ob die Zellen von mehreren der untersuchten Antikörper angefärbt werden, oder ob die Populationen getrennt voneinander zu betrachten sind. Es wäre zusätzlich interessant herauszufinden, ob der Verlust der Calcium-bindenden Proteine ein langsamer Prozess ist und die Zellen daran zugrunde gehen, oder ob sie zeitlebens die gleiche Menge der Calcium-bindenden Proteine beinhalten und somit andere Faktoren für den Zelluntergang verantwortlich sind. Dies könnte in einer Längsschnittstudie mit einer Immunfluoreszenzfärbung geklärt werden.

Schlussendlich reihen sich die Beobachtungen dieser Arbeit in die der aktuellen Forschung ein. Die GABAergen Interneuronen spielen eine große Rolle für das neuronale Netzwerk und die Pathologie dieser Zellen ist höchstwahrscheinlich maßgeblich an der Ausprägung der Alzheimer Erkrankung beteiligt. Inwiefern nun der beobachtete Verlust dieser Interneuronen eine Schlüsselstelle für die Pathologie der Alzheimer Erkrankung ist und einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellt, muss in weiteren Studien untersucht werden.

## 5 Zusammenfassung

Charakteristische Pathologien der Alzheimer-Krankheit sind die extrazellulären Amyloid-Plaques, frühe intrazelluläre A $\beta$ -Akkumulation und ein ausgeprägter Neuronenverlust. Das Tg4-42-Mausmodell exprimiert das A $\beta$ 4-42-Peptid, welches intrazellulär akkumuliert. Das 5xFAD-Mausmodell trägt Mutationen im *APP*- und *PS1*-Gen, welche zu einer ausgeprägten Amyloidose führen. Der Neuronenverlust wurde zuvor in beiden Mauslinien untersucht und ist im Hippocampus im CA1-Band v.a. in der Tg4-42-Mauslinie stark ausgeprägt. Inwiefern GABAerge Interneuronen von den pathologischen Veränderungen in den beiden Mausmodellen betroffen sind, war die Kernfrage dieser Arbeit. Es wurde eine immunhistochemische Färbung der GABAergen Interneuronen im Hippocampus von 12 Monate alten WT-, Tg4-42- und 5xFAD-Mäusen durchgeführt. Dafür wurden Antikörper gegen die Calcium-bindenden Proteine Parvalbumin, Calretinin und Calbindin genutzt. Es erfolgte eine Quantifizierung dieser Zellen, die einen deutlichen Verlust der GABAergen Interneuronen im Hippocampus der 5xFAD-Tiere ergab. Parvalbumin- und Calbindin-positive Zellen waren in allen untersuchten hippocampalen Regionen reduziert, Calretinin-positive Zellen v.a. im CA1- und CA2/3-Bereich. In der Tg4-42-Mauslinie wurde keine Reduktion der untersuchten Zellen festgestellt, obwohl in diesem Modell zuvor ein massiver Verlust der Pyramidenzellen im CA1-Band des Hippocampus festgestellt wurde. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Amyloid-Pathologie der 5xFAD-Mäuse und dem Interneuronen-Verlust in diesem Mausmodell wurde untersucht. V.a. der Verlust der Parvalbumin-positiven Zellen korrelierte mit der ausgeprägten Amyloidose in den untersuchten Bereichen im Hippocampus. Jedoch ist die Aussagekraft dieser Ergebnisse aufgrund von einer geringen Stichprobengröße eingeschränkt. Zudem wurde der Effekt der *Enriched Environment*-Bedingungen auf die Anzahl der GABAergen Interneuronen in dieser Arbeit untersucht. Zuvor hatten die *Enriched Environment*-Bedingungen einen positiven Effekt auf das Fortschreiten der Alzheimer-Pathologien der Tg4-42-Tiere gezeigt, nicht aber auf die der 5xFAD-Tiere. In dieser Arbeit wurde kein positiver Effekt der *Enriched Environment*-Bedingungen auf die Interneuronen-Zahl in beiden Mausmodellen gezeigt. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurden Erkenntnisse über die Anzahl der Interneuronen im Hippocampus in zwei relevanten Alzheimer-Mausmodellen erlangt. Die Ergebnisse deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Interneuronenverlust und der extrazellulären Amyloid-Pathologie in dieser Hirnregion hin.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW (2005): Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25, 4217–4221
- Albuquerque MS, Mahar I, Davoli MA, Chabot JG, Mechawar N, Quirion R, Krantic S (2015): Regional and sub-regional differences in hippocampal GABAergic neuronal vulnerability in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 7, Article 30
- Ali F, Baringer SL, Neal A, Choi EY, Kwan AC (2019): Parvalbumin-Positive Neuron Loss and Amyloid- $\beta$  Deposits in the Frontal Cortex of Alzheimer's Disease-Related Mice. *J Alzheimers Dis* 72, 1323–1339
- Alzheimer A (1911): Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* 4, 356–385
- 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
- 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
- Arai H, Emson PC, Mountjoy CQ, Carassco LH, Heizmann CW (1987): Loss of parvalbumin-immunoreactive neurones from cortex in Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 418, 164–169
- Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H (2004): Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable  $\beta$ -amyloid deposition. *Neuroreport* 15, 1751–1754
- Bäckman L, Jones S, Berger AK, Laukka EJ, Small BJ (2004): Multiple cognitive deficits during the transition to Alzheimer's disease. *J Intern Med* 256, 195–204
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, et al. (2010): Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* 21, 119–132
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992): Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15, 303–308
- Balthazar J, Schöwe NM, Cipolli GC, Buck HS, Viel TA (2018): *Enriched Environment Significantly Reduced Senile Plaques in a Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease, Improving Memory*. *Front Aging Neurosci* 10, 288
- Bayer TA, Wirths O (2010): Intracellular Accumulation of Amyloid-Beta – A Predictor for Synaptic Dysfunction and Neuron Loss in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2, 8

- Beydoun MA, Lhotsky A, Wang Y, Forno GD, An Y, Metter EJ, Ferrucci L, O'Brien R, Zonderman AB (2008): Association of Adiposity Status and Changes in Early to Mid-Adulthood With Incidence of Alzheimer's Disease. *Am J Epidemiol* 168, 1179–1189
- Blondell SJ, Hammersley-Mather R, Veerman JL (2014): Does physical activity prevent cognitive decline and dementia?: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Public Health* 14, 510
- Bloom GS (2014): Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* 71, 505–508
- Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M, Bayer TA (2013): N-truncated amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol* 126, 189–205
- Bouter Y, Kacprowski T, Weissmann R, Dietrich K, Borgers H, Brauß A, Sperling C, Wirths O, Albrecht M, Jensen LR, et al. (2014): Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing. *Front Aging Neurosci* 6, 75
- Brady DR, Mufson EJ (1997): Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer's diseased brain. *Neuroscience* 80, 1113–1125
- Brion JP, Révész A (1994): A subset of calretinin-positive neurons are abnormal in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 88, 33–43
- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, et al. (2004): Massive CA1/2 Neuronal Loss with Intraneuronal and N-Terminal Truncated A $\beta$ 42 Accumulation in a Novel Alzheimer Transgenic Model. *Am J Pathol* 165, 1289–1300
- Cattaud V, Bezzina C, Rey CC, Lejards C, Dahan L, Verret L (2018): Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment. *Neurobiol Aging* 72, 147–158
- Celio MR (1990): Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375–475
- Coelho FG de M, Vital TM, Stein AM, Arantes FJ, Rueda AV, Camarini R, Teodorov E, Santos-Galduróz RF (2014): Acute Aerobic Exercise Increases Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Elderly with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 39, 401–408
- Cotel MC, Bayer TA, Wirths O (2008): Age-dependent loss of dentate gyrus granule cells in APP/PS1KI mice. *Brain Res* 1222, 207–213
- Cotel MC, Jawhar S, Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O (2012): Environmental enrichment fails to rescue working memory deficits, neuron loss, and neurogenesis in APP/PS1KI mice. *Neurobiol Aging* 33, 96–107
- DeFelipe J (1997): Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14, 1–19

- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. (2020): Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. Informationsblatt 1, 1–10
- Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M (2010): Sex- and brain region-specific acceleration of  $\beta$ -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain* 3, 34
- DGPPN, DGN (2016): Demenzen. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) und der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN). Langversion. <https://dgn.org/leitlinien/leitlinie-diagnose-und-therapie-von-demenzen-2016>; abgerufen am 15.01.2021
- Eimer WA, Vassar R (2013): Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A $\beta$ 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener* 8, 2
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R (2010): Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77, 69–81
- Espinoza C, Guzman SJ, Zhang X, Jonas P (2018): Parvalbumin+ interneurons obey unique connectivity rules and establish a powerful lateral-inhibition microcircuit in dentate gyrus. *Nat Commun* 9, 4605
- Ferrer I, Soriano E, Tuñón T, Fonseca M, Guionnet N (1991): Parvalbumin immunoreactive neurons in normal human temporal neocortex and in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 106, 135–141
- Flanigan TJ, Xue Y, Kishan Rao S, Dhanushkodi A, McDonald MP (2014): Abnormal vibrissa-related behavior and loss of barrel field inhibitory neurons in 5xFAD transgenics. *Genes Brain Behav* 13, 488–500
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975): "Mini-mental state". *J Psychiatr Res* 12, 189–198
- Fonseca M, Soriano E (1995): Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Brain Res* 691, 83–91
- Franklin KBJ, Paxinos G (2001): *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2. Auflage; Academic Press, San Diego
- Friedland RP, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, Petot GJ, Debanne SM (2001): Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3440–3445
- Gall D, Roussel C, Susa I, D'Angelo E, Rossi P, Bearzatto B, Galas MC, Blum D, Schurmans S, Schiffmann SN (2003): Altered Neuronal Excitability in Cerebellar Granule Cells of Mice Lacking Calretinin. *J Neurosci* 23, 9320–9327
- García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, LaFerla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C (2011): Physical Exercise Protects Against Alzheimer's Disease in 3xTg-AD Mice. *J Alzheimers Dis* 24, 421–454
- Gerberding AL, Zampar S, Stazi M, Liebetanz D, Wirths O (2019): Physical Activity Ameliorates Impaired Hippocampal Neurogenesis in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ASN Neuro* 11, 1759091419892692

- German DC, Ng MC, Liang CL, McMahon A, Iacopino AM (1997): Calbindin-D28k in nerve cell nuclei. *Neuroscience* 81, 735–743
- Geula C, Bu J, Nagykerly N, Scinto LFM, Chan J, Joseph J, Parker R, Wu CK (2003): Loss of calbindin-D28k from aging human cholinergic basal forebrain: relation to neuronal loss. *J Comp Neurol* 455, 249–259
- Giesers NK, Wirths O (2020): Loss of Hippocampal Calretinin and Parvalbumin Interneurons in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *ASN Neuro* 12, 1759091420925356
- Gulyás AI, Hájos N, Freund TF (1996): Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 16, 3397–3411
- Hardy JA, Higgins GA (1992): Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185
- Hazra A, Gu F, Aulakh A, Berridge C, Eriksen JL, Ziburkus J (2013): Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer’s disease. *PloS One* 8, e64318
- Heizmann CW (1992): Calcium-binding proteins: basic concepts and clinical implications. *Gen Physiol Biophys* 11, 411–425
- Héraud C, Goufak D, Ando K, Leroy K, Suain V, Yilmaz Z, De Decker R, Authélet M, Laporte V, Octave JN, Brion JP (2014): Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol Dis* 62, 100–112
- Hernández F, Avila J (2008): Tau aggregates and tau pathology. *J Alzheimers Dis JAD* 14, 449–452
- Heyn P, Abreu BC, Ottenbacher KJ (2004): The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: a meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil* 85, 1694–1704
- Hijazi S, Heistek TS, Scheltens P, Neumann U, Shimshek DR, Mansvelder HD, Smit AB, van Kesteren RE (2019): Early restoration of parvalbumin interneuron activity prevents memory loss and network hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Mol Psychiatry* 25, 3380–3398
- Hof PR, Cox K, Young WG, Celio MR, Rogers J, Morrison JH (1991): Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer’s disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 50, 451–462
- Hof PR, Glezer II, Condé F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM (1999): Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat* 16, 77–116
- Hu YS, Xu P, Pigino G, Brady ST, Larson J, Lazarov O (2010): Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer’s disease-linked APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>DeltaE9</sup> mice. *FASEB J* 24, 1667–1681

- Huh S, Baek SJ, Lee KH, Whitcomb DJ, Jo J, Choi SM, Kim DH, Park MS, Lee KH, Kim BC (2016): The reemergence of long-term potentiation in aged Alzheimer's disease mouse model. *Sci Rep* 6, 29152
- Hüttenrauch M (2016): Alzheimer-like pathology in murine transgenic models: disease modification by environmental and genetic interventions. *Rer. Nat. Diss. Göttingen* 2016
- Hüttenrauch M, Salinas G, Wirths O (2016a): Effects of Long-Term Environmental Enrichment on Anxiety, Memory, Hippocampal Plasticity and Overall Brain Gene Expression in C57BL6 Mice. *Front Mol Neurosci* 9, 62
- Hüttenrauch M., Brauß A, Kurdakova A, Borgers H, Klinker F, Liebetanz D, Salinas-Riester G, Wiltfang J, Klafki HW, Wirths O (2016b): Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model. *Transl Psychiatry* 6, e800
- Hüttenrauch M, Walter S, Kaufmann M, Weggen S, Wirths O (2017): Limited Effects of Prolonged Environmental Enrichment on the Pathology of 5XFAD Mice. *Mol Neurobiol* 54, 6542–6555
- Iacopino AM, Christakos S (1990): Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4078–4082
- Iacopino AM, Christakos S, German D, Sonsalla PK, Altar CA (1992): Calbindin-D28K-containing neurons in animal models of neurodegeneration: possible protection from excitotoxicity. *Brain Res Mol Brain Res* 13, 251–261
- Jankowsky JL, Xu G, Fromholt D, Gonzales V, Borchelt DR (2003): Environmental enrichment exacerbates amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1220–1227
- Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, Sealock J, Karlsson IK, Hägg S, Athanasiu L, et al. (2019): Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet* 51, 404–413
- 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 $\beta$  aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 29–40
- Jiang Q, Lee CYD, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL, et al. (2008): ApoE promotes the proteolytic degradation of A $\beta$ . *Neuron* 58, 681–693
- Jinno S, Kosaka T (2006): Cellular architecture of the mouse hippocampus: A quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res* 56, 229–245
- Ke HC, Huang HJ, Liang KC, Hsieh-Li HM (2011): Selective improvement of cognitive function in adult and aged APP/PS1 transgenic mice by continuous non-shock treadmill exercise. *Brain Res* 1403, 1–11

- Kidd M (1963): Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature* 197, 192–193
- Klausberger T (2009): GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *Eur J Neurosci* 30, 947–957
- Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JHJ, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, et al. (2005): Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25, 9782–9793
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VMY, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005): Environmental Enrichment Reduces A $\beta$  Levels and Amyloid Deposition in Transgenic Mice. *Cell* 120, 701–713
- Lemmens MAM, Sierksma ASR, Rutten BPF, Dennissen F, Steinbusch HWM, Lucassen PJ, Schmitz C (2011): Age-related changes of neuron numbers in the frontal cortex of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 216, 227–237
- Leroy K, Ando K, Laporte V, Dedecker R, Suain V, Authelet M, Héraud C, Pierrot N, Yilmaz Z, Octave JN, Brion JP (2012): Lack of tau proteins rescues neuronal cell death and decreases amyloidogenic processing of APP in APP/PS1 mice. *Am J Pathol* 181, 1928–1940
- Leuba G, Kraftsik R, Saini K (1998): Quantitative Distribution of Parvalbumin, Calretinin, and Calbindin D-28k Immunoreactive Neurons in the Visual Cortex of Normal and Alzheimer Cases. *Exp Neurol* 152, 278–291
- Liu H, Zhao G, Zhang H, Shi L (2013): Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behav Brain Res* 256, 261–272
- Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, et al. (2017): Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet Lond Engl* 390, 2673–2734
- Macdonald IR, DeBay DR, Reid GA, O'Leary TP, Jollymore CT, Mawko G, Burrell S, Martin E, Bowen CV, Brown RE, Darvesh S (2014): Early Detection of Cerebral Glucose Uptake Changes in the 5XFAD Mouse. *Curr Alzheimer Res* 11, 450–460
- Mahar I, Albuquerque MS, Mondragon-Rodriguez S, Cavanagh C, Davoli MA, Chabot JG, Williams S, Mechawar N, Quirion R, Krantic S (2016): Phenotypic Alterations in Hippocampal NPY- and PV-Expressing Interneurons in a Presymptomatic Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 8, 327
- Manji Z, Rojas A, Wang W, Dingleline R, Varvel NH, Ganesh T (2019): 5xFAD Mice Display Sex-Dependent Inflammatory Gene Induction During the Prodromal Stage of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 70, 1259–1274
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004): Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5, 793–807
- Marlatt MW, Potter MC, Bayer TA, van Praag H, Lucassen PJ (2013): Prolonged running, not fluoxetine treatment, increases neurogenesis, but does not alter neuropathology, in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Top Behav Neurosci* 15, 313–340

- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985): Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4, 2757–2763
- Mattson MP (2007): Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6, 337–350
- Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S (1991): Evidence for calcium-reducing and excitatory-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 6, 41–51
- Mayeux R, Stern Y (2012): Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2
- Merino-Serrais P, Tapia-González S, DeFelipe J (2020): Calbindin immunostaining in the CA1 hippocampal pyramidal cell layer of the human and mouse: A comparative study. *J Chem Neuroanat* 104, 101745
- Mikkonen M, Alafuzoff I, Tapiola T, Soininen H, Miettinen R (1999): Subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28K immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92, 515–532
- Molinari S, Battini R, Ferrari S, Pozzi L, Killcross AS, Robbins TW, Jouvenceau A, Billard JM, Dutar P, Lamour Y, et al. (1996): Deficits in memory and hippocampal long-term potentiation in mice with reduced calbindin D28K expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8028–8033
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, et al. (2009): Extracellular Amyloid- $\beta$  and Cytotoxic Glial Activation Induce Significant Entorhinal Neuron Loss in Young PS1 M146L/APP 751SL Mice. *J Alzheimers Dis* 18, 755–776
- Mount C, Downton C (2006): Alzheimer disease: progress or profit? *Nat Med* 12, 780–784
- Mountjoy CQ, Roth M, Evans NJ, Evans HM (1983): Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. *Neurobiol Aging* 4, 1–11
- Nhan HS, Chiang K, Koo EH (2015): The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol* 129, 1–19
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, et al. (2006): Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129–10140
- Ognjanovski N, Schaeffer S, Wu J, Mofakham S, Maruyama D, Zochowski M, Aton SJ (2017): Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation. *Nat Commun* 8, 15039
- Palop JJ, Mucke L (2010): Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13, 812–818
- Palop JJ, Mucke L (2016): Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 17, 777–792

- Palop JJ, Jones B, Kekoni L, Chin J, Yu GQ, Raber J, Masliah E, Mucke L (2003): Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9572–9577
- Pearson RC, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TP (1985): Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4531–4534
- Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, Tricoire L, Wester JC, McBain CJ (2017): Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol Rev* 97, 1619–1747
- Phillips C, Baktir MA, Das D, Lin B, Salehi A (2015): The Link Between Physical Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Disease. *Phys Ther* 95, 1046–1060
- Popović M, Caballero-Bleda M, Kadish I, Van Groen T (2008): Subfield and layer-specific depletion in calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the dentate gyrus of amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. *Neuroscience* 155, 182–191
- 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
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010): Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362, 329–344
- Richter H, Ambrée O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, Palme R, Touma C, Schäbitz WR, Sachser N (2008): Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom? *Behav Brain Res* 190, 74–84
- Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC (1964): Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: A replication and extension. *J Comp Physiol Psychol* 55, 429
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J (2011): Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71, 45–61
- Saiz-Sanchez D, Ubeda-Bañon I, De la Rosa-Prieto C, Martinez-Marcos A (2012): Differential expression of interneuron populations and correlation with amyloid- $\beta$  deposition in the olfactory cortex of an A $\beta$ PP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 31, 113–129
- Saiz-Sanchez D, De la Rosa-Prieto C, Ubeda-Bañon I, Martinez-Marcos A (2015): Interneurons, tau and amyloid- $\beta$  in the piriform cortex in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 220, 2011–2025
- Sanchez-Mejias E, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, Mejias-Ortega M, Trujillo-Estrada L, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, et al. (2020): Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients. *Brain Pathol Zurich Switz* 30, 345–363
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Brickman AM, Cosentino S, Schupf N, Xin-Tang M, Gu Y, Stern Y (2011): Physical activity and Alzheimer disease course. *Am J Geriatr Psychiatry* 19, 471–481

- Selkoe DJ (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741–766
- Selkoe DJ, Hardy J (2016): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595–608
- Seress L, Gulyás AI, Ferrer I, Tunon T, Soriano E, Freund TF (1993): Distribution, morphological features, and synaptic connections of parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in the human hippocampal formation. *J Comp Neurol* 337, 208–230
- Seshadri S, Drachman DA, Lippa CF (1995): Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Allele and the Lifetime Risk of Alzheimer's Disease: What Physicians Know, and What They Should Know. *Arch Neurol* 52, 1074–1079
- Siwek ME, Müller R, Henseler C, Trog A, Lundt A, Wormuth C, Broich K, Ehninger D, Weiergräber M, Papazoglou A (2015): Altered theta oscillations and aberrant cortical excitatory activity in the 5XFAD model of Alzheimer's disease. *Neural Plast* 2015, 781731
- Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD (1991): Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 308, 381–396
- Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, Troncoso J, Legido-Quigley C, Thambisetty M (2017): Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med* 14, e1002266
- Stazi M, Wirths O (2021a): Chronic Memantine Treatment Ameliorates Behavioral Deficits, Neuron Loss, and Impaired Neurogenesis in a Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 58, 204–216
- Stazi M, Wirths O (2021b): Physical activity and cognitive stimulation ameliorate learning and motor deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 397, 112951
- Stefanits H, Wesseling C, Kovacs GG (2014): Loss of Calbindin immunoreactivity in the dentate gyrus distinguishes Alzheimer's disease from other neurodegenerative dementias. *Neurosci Lett* 566, 137–141
- Stuart KE, King AE, King NE, Collins JM, Vickers JC, Ziebell JM (2019): Late-life environmental enrichment preserves short-term memory and may attenuate microglia in male APP/PS1 mice. *Neuroscience* 408, 282–292
- Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BPF, Van Der Kolk N, Perl DP, Bouras C, Steinbusch HWM, Schmitz C, Hof PR, Dickstein DL (2010): Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* 214, 145–160
- Tanzi RE, Bertram L (2001): New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32, 181–184
- Tremblay R, Lee S, Rudy B (2016): GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–292

- Verdaguer E, Brox S, Petrov D, Olloquequi J, Romero R, de Lemos ML, Camins A, Auladell C (2015): Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis. *Exp Gerontol* 69, 176–188
- Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AMI, Cobos I, Ho K, Devidze N, Masliah E, Kreitzer AC, Mody I, et al. (2012): Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149, 708–721
- von Strauss E, Viitanen M, De Ronchi D, Winblad B, Fratiglioni L (1999): Aging and the occurrence of dementia: findings from a population-based cohort with a large sample of nonagenarians. *Arch Neurol* 56, 587–592
- Wagner JM, Sichler ME, Schleicher EM, Franke TN, Irwin C, Löw MJ, Beindorff N, Bouter C, Bayer TA, Bouter Y (2019): Analysis of Motor Function in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Behav Neurosci* 13, 107
- Wang H, Li Q, Tang H, Ding J, Xu N, Sun S, Chen S (2019): The activated newborn neurons participate in enriched environment induced improvement of locomotor function in APP/PS1 mice. *Brain Behav* 9, e01316
- Whitmer RA, Gunderson EP, Quesenberry CP, Zhou J, Yaffe K (2007): Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Curr Alzheimer Res* 4, 103–109
- Wirhth O, Zampar S (2020): Neuron Loss in Alzheimer's Disease: Translation in Transgenic Mouse Models. *Int J Mol Sci* 21, 8144
- Wirhth O, Multhaup G, Czech C, Feldmann N, Blanchard V, Tremp G, Beyreuther K, Pradier L, Bayer TA (2002): Intraneuronal APP/A $\beta$  Trafficking and Plaque Formation in  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein and Presenilin-1 Transgenic Mice. *Brain Pathol Zurich Switz* 12, 275–286
- Wirhth O, Multhaup G, Bayer TA (2004): A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide - the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91, 513–520
- Xia F, Richards BA, Tran MM, Josselyn SA, Takehara-Nishiuchi K, Frankland PW (2017): Parvalbumin-positive interneurons mediate neocortical-hippocampal interactions that are necessary for memory consolidation. *eLife* 6, e27868
- Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG (2009): Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 35, 426–432
- Zallo F, Gardenal E, Verkhatsky A, Rodríguez JJ (2018): Loss of calretinin and parvalbumin positive interneurons in the hippocampal CA1 of aged Alzheimer's disease mice. *Neurosci Lett* 681, 19–25
- Zhang Y, Wang G, Wang L, Zhao J, Huang R, Xiong Q (2018): The short-term improvements of enriched environment in behaviors and pathological changes of APP/PS1 mice via regulating cytokines. *Hum Vaccines Immunother* 14, 2003–2011

---

Zhu XC, Tan L, Wang HF, Jiang T, Cao L, Wang C, Wang J, Tan CC, Meng XF, Yu JT (2015):  
Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis.  
*Ann Transl Med* 3, 38

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung, Mithilfe und Anregungen folgender Personen bedanken: meinem Doktorvater und gleichzeitig auch direktem Betreuer Prof. Wirths, der in der Zeit der Umsetzung dieser Dissertation eine große und konstante Hilfe war. Dr. Melanie Hüttenrauch, deren Arbeit ich weiterführen durfte und mich in der Anfangszeit eingearbeitet hat. Martina Stazi und Silvia Zampar, ohne die die Zeit im Labor nicht halb so viel Spaß gemacht hätte und die mir auch fachlich immer zur Seite standen. Petra Tucholla, die mich in der praktischen Umsetzung unterstützte.