

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

**Passive Immunisierung mit dem  
monoklonalen Antikörper NT4X am  
Tg4-42-Mausmodell für die sporadische  
Form der Alzheimer Erkrankung**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Philipp Henniges**

aus

Einbeck

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. T. A. Bayer

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

### **Prüfungskommission**

Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. T. A. Bayer

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 21.02.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X am Tg4-42-Mausmodell für die sporadische Form der Alzheimer Erkrankung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

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

Bouter C, **Henniges P**, Franke TN, Irwin C, Sahlmann CO, Sichter ME, Beindorff N, Bayer TA, Bouter Y (2018): (18)F-FDG-PET Detects Drastic Changes in Brain Metabolism in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 10, 425

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Alzheimer-Demenz .....	1
1.2 Epidemiologie .....	1
1.3 Risikofaktoren .....	2
1.4 Protektive Maßnahmen .....	2
1.5 Klinische Merkmale .....	3
1.5.1 Symptomatik und Krankheitsverlauf .....	3
1.5.2 Diagnostische Möglichkeiten .....	4
1.5.3 Therapie .....	5
1.6 Neuropathologische Merkmale .....	6
1.6.1 Amyloid-Plaques und zerebrale Amyloidangiopathie .....	6
1.6.2 Neurofibrillenbündel .....	7
1.6.3 Atrophie und Nervenzellverlust .....	8
1.6.4 Neuroinflammation .....	9
1.6.5 Neurogenese .....	9
1.7 Pathomechanismen des Morbus Alzheimer .....	10
1.7.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein .....	10
1.7.2 Die APP-Prozessierung .....	10
1.7.3 Die Amyloidhypothese .....	12
1.7.4 Die modifizierte Amyloidhypothese .....	13
1.7.5 Die A $\beta$ -Varianten und die physiologischen Funktionen des A $\beta$ .....	15
1.8 Genetik der Alzheimererkrankung .....	17
1.8.1 Die „ <i>early-onset</i> “-Alzheimerdemenz .....	18
1.8.2 Die „ <i>late-onset</i> “-Alzheimerdemenz .....	18
1.9 Das Tg4-42-Mausmodell .....	19
1.10 Die Antikörpertherapie als Behandlungsansatz .....	21
1.10.1 Konzept der aktiven Immunisierung .....	21
1.10.2 Konzept der passiven Immunisierung .....	21
1.11 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit .....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1 Material .....	26
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits .....	26
2.1.2 Technische Apparaturen .....	28
2.1.3 Weitere Utensilien .....	29
2.1.4 Antikörper .....	30

2.1.5	Tiere .....	31
2.1.6	Aufbereitung des Hirngewebes.....	32
2.2	Methoden .....	32
2.2.1	Genotypisierung von Tg4-42-Mäusen.....	32
2.2.2	Analyse der A $\beta$ <sub>42</sub> -Expression in Tg4-42-Mäusen.....	34
2.2.3	Quantifizierung der Neuronenzahl und des Volumens.....	34
2.2.4	Quantifizierung der Neurogenese .....	39
2.2.5	Quantifizierung der Mikro- und Astroglieose .....	41
2.3	Statistik .....	45
2.4	Software.....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1	Nachweis des Transgens in homozygoten Tg4-42-Mäusen.....	46
3.2	A $\beta$ <sub>42</sub> -Expression in Regionen des Hippocampus im Tg4-42-Mausmodell.....	46
3.3	Vergleichende Analyse der Neuronenzahl sowie des Volumens im Bereich des GD von dreimonatigen Tg4-42-Mäusen mit gleichalten WT-Tieren.....	47
3.4	Einfluss der Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X auf die Neuronenzahl und das Volumen im Tg4-42-Mausmodell.....	48
3.4.1	Neuronenzahl und Volumen des GD .....	48
3.4.2	Neuronenzahl und Volumen in der CA2/3-Region des Hippocampus .....	50
3.5	Neurogenese in der SGZ des GD unter der passiven Immunisierung mit NT4X .....	53
3.6	Neuroinflammatorische Prozesse im Bereich des Hippocampus.....	54
3.6.1	Analyse der Mikroglieose.....	55
3.6.2	Analyse der Astroglieose.....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
4.1	A $\beta$ -Expression im Bereich des Hippocampus bei jungen homozygoten Tg4-42-Mäusen.....	61
4.2	Einfluss des NT4X-Antikörpers auf die Neuronenzahl und das Volumen des GD sowie der CA2/3-Region des Hippocampus von sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen.....	63
4.2.1	NT4X kann den Nervenzellverlust bei homozygoten Tg4-42-Mäusen im GD signifikant reduzieren .....	64
4.2.2	Homozygote Tg4-42-Mäuse weisen im Vergleich zu WT-Tieren eine reduzierte Neuronenzahl in der CA2/3-Region des Hippocampus auf.....	66
4.2.3	Sechsmonatige homozygote Tg4-42-Mäuse zeigen eine signifikante Volumenreduktion im Bereich des GD .....	67
4.3	Therapieansatz der passiven Immunisierung mit dem monoklonalen NT4X-Antikörper.....	69
4.4	Auswirkungen der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X auf die Neurogenese im Tg4-42-Mausmodell .....	71
4.5	Neuroinflammatorische Prozesse im Bereich des Hippocampus unter der Immuntherapie mit NT4X .....	74
4.5.1	Die passive Immunisierung mit dem Antikörper NT4X führt bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Mikroglieose.....	75

---

4.5.2	Homozygote sechsmonatige Tg4-42-Mäuse zeigen eine gesteigerte Astrogliose im Hippocampusbereich .....	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>81</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die APP-Prozessierung. ....	12
Abbildung 2: Vergleich der beiden Amyloidhypothesen. ....	14
Abbildung 3: Übersicht über den Bereich des GD. ....	36
Abbildung 4: Übersicht über die CA2- und CA3-Region des Hippocampus. ....	36
Abbildung 5: Schematische Veranschaulichung des Zählrahmens sowie kurze Erläuterung der Stereologie-Regeln. ....	37
Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Methodik der stereologischen Quantifizierung der Neurogenese. ....	40
Abbildung 7: Schema der Bildaufnahme zur Quantifizierung der Neuroinflammation. ....	43
Abbildung 8: Schwellenwert zur Quantifizierung der neuroinflammatorischen Prozesse. ....	43
Abbildung 9: Gelelektrophoretischer Nachweis des Transgens bei homozygoten Tg4-42-Mäusen. ....	46
Abbildung 10: A $\beta$ <sub>42</sub> -Expression im Bereich des Hippocampus bei Tg4-42-Mäusen. ....	47
Abbildung 11: Vergleich von Neuronenzahl und Volumen des GD bei dreimonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen mit gleichalten WT-Tieren. ....	48
Abbildung 12: Behandlungseffekt der passiven Immunisierung mit NT4X auf die Nervenzellzahl und das Volumen des GD bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen. ....	49
Abbildung 13: Vergleichende Übersicht des GD. ....	50
Abbildung 14: Reduzierte Nervenzellzahl in der CA2/3-Region des Hippocampus bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen. ....	51
Abbildung 15: Vergleich des Volumens in der CA2/3-Region des Hippocampus. ....	52
Abbildung 16: Gegenüberstellende Darstellung der CA2/3-Region des Hippocampus. ....	52
Abbildung 17: Analyse der Neurogenese unter der Immunisierung mit dem Antikörper NT4X. ....	53
Abbildung 18: Exemplarische bildliche Gegenüberstellung der Neurogenese in der SGZ des GD. ....	54
Abbildung 19: Effekt der passiven Immunisierung mittels NT4X-Antikörper auf die Mikroglie im Hippocampus. ....	55
Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der reaktiven Mikroglie. ....	56
Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung der Mikrogliaaktivität. ....	57
Abbildung 22: Analyse der Astroglie im Bereich des Hippocampus. ....	58
Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der Astroglie. ....	59
Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung der Astroglie. ....	59



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Kits .....	26
Tabelle 2: Geräteliste .....	28
Tabelle 3: Weitere Utensilien und Produkte .....	29
Tabelle 4: Primäre Antikörper.....	30
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper.....	31
Tabelle 6: Mastermix für eine Tg4-42-PCR .....	33
Tabelle 7: Protokoll der Temperaturzyklen im Thermocycler.....	33
Tabelle 8: Parameter der stereologischen Analysen.....	37
Tabelle 9: Verwendete Software .....	45

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer-Demenz
ADI	Alzheimer's Disease International
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
ADAMTS4	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i> , APP intrazelluläre Domäne
APH-1	<i>anterior pharynx-defective-1</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
A $\beta$	beta-Amyloid
BACE 1	<i><math>\beta</math>-site APP cleavage enzyme 1</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CA	<i>Cornu ammonis</i>
CAA	<i>cerebral amyloid angiopathy</i> , zerebrale Amyloidangiopathie
CT	Computertomographie
CTF	C-terminales Fragment
DAB	Diaminobenzidin
DAlzG	Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V.
DCX	Doublecortin
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	entorhinaler Kortex
EOAD	<i>early-onset AD</i>
fAD	familiäre Form der AD
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
ICD-10	<i>International Classification of Diseases-10</i>
IgG	Immunglobulin-G
LOAD	<i>late-onset Alzheimer Demenz</i>
MCI	<i>mild cognitive impairment</i>
MMST	<i>Mini-Mental-Status-Test</i>
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment-Test</i>
N-Terminus	Amino-Terminus

---

NEP	Neprilysin
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i> , Neurofibrillenbündel
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEN-2	<i>presenilin enhancer-2</i>
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	phosphatgepufferte Formaldehydlösung
PHF	<i>paired helical filaments</i> , gepaarte helikale Filamente
PS-1	Presenilin-1
PS-2	Presenilin-2
QC	Glutaminylcyclase
sAAP $\alpha$	<i>secreted amyloid precursor protein <math>\alpha</math></i>
sAAP $\beta$	<i>secreted amyloid precursor protein <math>\beta</math></i>
sAD	sporadische Form der AD
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SGZ	subgranuläre Zone
SPF	spezifisch pathogenfreie Bedingungen
SVZ	subventrikuläre Zone
TACE	<i>tumour necrosis factor-<math>\alpha</math> convertase</i>
TRH	<i>Thyrotropin-Releasing hormone</i>
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
ZTE	zentrale tierexperimentelle Einrichtung

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer-Demenz

Als „Demenz“ wird eine chronische Hirnerkrankung bezeichnet, die in ihrem Verlauf Einfluss auf die Kognition nimmt und zu einer progredienten geistigen Degeneration führt und durch verschiedene Demenzformen bedingt sein kann (Maclin et al. 2019). Von der geläufigsten Alzheimer-Demenz (AD), welche mit einem prozentualen Anteil von über 70% die häufigste klinische Form darstellt, werden unter anderem eine vaskuläre Demenz, eine frontotemporale Demenz sowie eine Lewy-Körper-Demenz unterschieden (Barker et al. 2002).

Das Erkrankungsbild der AD wurde in den Grundzügen bereits im Jahre 1907 durch den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer 1907). Er schilderte in seinen Ausführungen die Symptome einer 51-jährigen Patientin, Auguste Deter, welche in ihrem Krankheitsverlauf rapide Gedächtniseinschränkungen, Desorientiertheit, auditive Halluzinationen sowie eine ausgeprägte Hilflosigkeit entwickelte (Alzheimer et al. 1995). Alois Alzheimer ging bereits damals auf die wesentlichen makro- und mikroskopischen Charakteristika der Erkrankung, wie eine ausgeprägte Gehirnatrophie, beta-Amyloid (A $\beta$ )-Ablagerungen und Neurofibrillenbündel (*neurofibrillary tangles*, NFT), ein (Alzheimer et al. 1995). Auch über 100 Jahre später bildet diese Erkrankung weiterhin einen Gegenstand aktueller Forschungsbestrebungen um detailliertere Einblicke in die Pathogenese zu erlangen und so bislang fehlende suffiziente Therapiekonzepte zu entwickeln.

## 1.2 Epidemiologie

Weltweit leben nach Angaben des World Alzheimer Reports 2019 etwas über 50 Millionen Menschen mit einer Demenzerkrankung. Diese Zahl wird schätzungsweise bis zum Jahr 2050 auf rund 152 Millionen Erkrankte ansteigen (ADI 2019). Bezogen auf Deutschland sind gegenwärtig etwa 1,7 Millionen Menschen von einer Demenz betroffen (DAIzG 2018). Die jährliche Inzidenz liegt hier bei etwas mehr als 300.000 Neuerkrankungen. Etwa zwei Drittel der im höheren Lebensalter auftretenden Demenzen entfallen dabei mutmaßlich aufgrund der etwas höheren Lebenserwartung auf das weibliche Geschlecht (DAIzG 2018).

Diese Zahlen verdeutlichen somit nicht nur die gegenwärtigen Auswirkungen auf unser Gesundheitssystem, sondern stellen auch weiterhin eine große Herausforderung für unsere im demographischen Wandel befindliche Gesellschaft dar.

### 1.3 Risikofaktoren

Neben genetisch bedingten Risikofaktoren, auf die später noch dezidiert eingegangen werden soll (siehe Absatz 1.8), gibt es zahlreiche Faktoren und Prädispositionen, denen ein Einfluss auf die Entstehung der AD zugesprochen wird. Auch wenn die detaillierte Ätiologie dieser Erkrankung noch unklar ist, lässt sich aktuell eine Kombination bzw. Wechselwirkung zwischen genetischen und Umweltfaktoren annehmen (Mayeux und Stern 2012). Neben der genetischen Komponente, welcher rund 70% des Risikos für eine AD attribuiert werden kann (Silva et al. 2019), stellt das Lebensalter einen der wichtigsten nicht beeinflussbaren Risikofaktoren für AD dar (Herrup 2010). Mit zunehmendem Alter nimmt auch die Prävalenz der AD zu: So kann bei Individuen von 75 bis 84 Jahren von einem prozentualen Anteil von ungefähr 19% ausgegangen werden, wohingegen in der Altersgruppe der über 85-Jährigen schon mit Prävalenzen von 30 – 35%, ggf. sogar von bis zu 50% gerechnet werden muss (Armstrong 2019). Darüber hinaus stehen auch zerebrovaskuläre Erkrankungen mit den daraus resultierenden zerebralen Veränderungen, wie hämorrhagische Infarkte, ischämische Infarkte oder Vaskulopathien, im Verdacht das Risiko für eine Demenz zu erhöhen (Silva et al. 2019). Im Rahmen einer longitudinalen Studie konnte durch Skoog et al. (1996) die Verbindung zwischen hypertonen Blutdruckwerten und einer im späteren Lebensalter entwickelten Demenz nachgewiesen werden. Aber auch eine ausgeprägte Dyslipidämie soll über erhöhte Cholesterolverwerte und den daraus resultierenden Effekten Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) haben und so das Alzheimerisiko erhöhen (Bowman et al. 2012; Silva et al. 2019). In einer durch Gudala et al. (2013) durchgeführten Metaanalyse konnte für Patienten mit Diabetes mellitus ein bis zu 56% erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AD festgestellt werden. Ebenfalls scheinen Schädel-Hirn-Traumata über eine Induktion von Tau-Hyperphosphorylierung sowie anschließender Aggregation einen Risikofaktor für die AD darzustellen (Edwards et al. 2020). Unter anderem werden auch Tabakkonsum (Doll et al. 2000) sowie extremes Unter- (Buchman et al. 2005) oder Übergewicht (Profenno et al. 2010) als beeinflussende Risikofaktoren diskutiert.

### 1.4 Protektive Maßnahmen

Allerdings sind in der Literatur auch einige protektive Faktoren und Verhaltensweisen beschrieben, welche das Risiko an einer AD zu erkranken senken können. So konnten in wissenschaftlichen Analysen die positive Assoziation eines höheren Bildungsstandes, der Ausübung einer komplexen beruflichen Tätigkeit sowie einer mental und sozial integrierten Lebensführung im höheren Lebensalter erhoben werden, welche nachweislich das Auftreten einer Demenz verzögern konnten (Fratiglioni und Wang 2007). Scarmeas et al. (2006) konnten im Rahmen einer größeren Studie aufzeigen, dass die Einhaltung einer mediterranen Diät mit einer Reduktion des AD-Risikos in Verbindung steht. Ebenso belegen an Tieren sowie Menschen durchgeführte Untersuchungen einen Vorteil von fortwährender physischer Aktivität für die Bewahrung einer höheren kognitiven *Performance* im Alter (Kirk-Sanchez und

McGough 2014). Allerdings sollte angemerkt werden, dass etwaige protektive Lebensstilveränderungen über die gesamte Lebensspanne aufrechterhalten werden sollten, um das individuelle Erkrankungsrisiko wirklich signifikant zu senken (Armstrong 2019).

## 1.5 Klinische Merkmale

### 1.5.1 Symptomatik und Krankheitsverlauf

Die AD ist eine chronische neurodegenerative Erkrankung, die im Verlauf unter anderem durch progrediente kognitive Einschränkungen Einfluss auf die Aktivitäten des alltäglichen Lebens nehmen kann (Lane et al. 2018). Der zeitliche Verlauf der Erkrankung lässt sich in drei aufeinander folgende Phasen unterteilen (Albert et al. 2011; McKhann et al. 2011; Sperling et al. 2011). Die Länge der einzelnen Phasen sowie die Verweildauer des Individuums in der jeweiligen Phase kann jedoch von diversen Faktoren, wie beispielsweise Alter, Genetik oder Geschlecht, beeinflusst werden (Alzheimer's Association 2020; Vermunt et al. 2019).

Im präklinischen Stadium können sich bereits erste bildmorphologische Befunde sowie eine Positivität bestimmter Biomarker zeigen, welche jedoch noch kompensiert werden können, sodass betroffene Patienten keinerlei Symptome oder sonstige Einschränkungen aufweisen (Alzheimer's Association 2020). Dieser Nachweis Alzheimer-typischer Veränderungen bedingt jedoch nicht zwangsläufig den Progress in die nachfolgenden Erkrankungsstadien oder überhaupt das Vorliegen einer neurodegenerativen Erkrankung, denn diese Veränderungen können teilweise auch im Rahmen des normalen Alterungsprozesses auftreten (Bennett et al. 2006).

Das sich anschließende Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung (*mild cognitive impairment*, MCI) zeichnet sich durch den Nachweis von positiven Biomarkern mit simultanem Vorliegen kognitiver Einschränkungen aus, welche den Patienten jedoch noch nicht in der alltäglichen Lebensführung beeinträchtigen (Alzheimer's Association 2020). In einer aktuellen Analyse konnten Petersen et al. (2018) bestätigen, dass fast 15% der über 65-jährigen Patienten mit MCI innerhalb eines zweijährigen *Follow-ups* eine manifeste AD entwickelten.

Das finale Stadium der manifesten AD, welches durch Alzheimer-assoziierte Gehirnveränderungen mit Vorliegen von Gedächtnis- und Verhaltensauffälligkeiten, die das Individuum in der täglichen Lebensführung beeinträchtigen, wird wiederum gegenwärtig durch die Alzheimer's Association in eine milde, moderate und schwer ausgeprägte Form unterteilt. Bei mildem Ausprägungsgrad besitzen die meisten Patienten in vielen Bereichen ihres Lebens nach wie vor eine gewisse Eigenständigkeit und benötigen nur für wenige Tätigkeiten fremde Unterstützung (Alzheimer's Association 2020). Bei der moderaten AD zeigen die Patienten hingegen ein eingeschränktes Kommunikationsverhalten, Schwierigkeiten bei Routinetätig-

keiten des täglichen Lebens, wie beispielsweise beim Baden oder Anziehen, sowie erste Persönlichkeits- und Verhaltensänderungen (Alzheimer's Association 2020). Die schwere Form der AD ist durch ausgeprägte Einschränkungen im Alltag charakterisiert, welche eine Rund-um-die-Uhr-Betreuung erfordern, zumal die Patienten durch Beeinträchtigungen in den für die Körperbewegung verantwortlichen Hirnregionen an das Krankenbett gebunden sein können (Alzheimer's Association 2020). Auch stellt ein womöglich funktionell beeinträchtigter Schluckakt mit konsekutiver Entwicklung einer (Aspirations-)Pneumonie neben ischämischen Herzerkrankungen eine der häufigsten Todesursachen der Patienten dar (Brunnstrom und Englund 2009).

### 1.5.2 Diagnostische Möglichkeiten

Die definitive Diagnose einer Demenzerkrankung vom Alzheimer-Typ lässt sich auch gegenwärtig nur *post mortem* durch eine neuropathologische Untersuchung verifizieren, bei der als wesentliche Kriterien der erfolgte Nachweis von Amyloidplaques, NFT sowie neuritischen Plaques im Hirngewebe gelten (Hyman et al. 2012).

Nach einer von der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) sowie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) im Januar 2016 herausgegebenen S3-Leitlinie „Demenzen“ gilt die Demenz allgemein als ein klinisches Syndrom, welches durch die *International Classification of Diseases-10* (ICD-10) definiert wird und damit eine klinisch beschreibende Diagnose darstellt. Primär sollte im diagnostischen Prozess bei Hinweisen auf kognitive Leistungsbeeinträchtigungen, auftretenden Persönlichkeitsveränderungen oder Problemen der Alltagsbewältigung, welche insgesamt den Verdacht einer Demenzerkrankung nahelegen könnten, eine ausführliche Eigen-, Fremd-, Familien- und Sozialanamnese erfolgen (Leitlinie Demenzen 2016). Ebenfalls sollte der Medikamentenanamnese eine bedeutende Rolle zukommen, da kognitive Einschränkungen auch durch bestimmte Medikamentengruppen induziert werden können (Carriere et al. 2009). Dem Diagnosealgorithmus folgend sollte die Anamnese durch eine körperliche sowie psychopathologische Untersuchung ergänzt werden um wesentliche Differenzialdiagnosen zur Demenz, wie etwa eine Depression, ein Delir oder etwa eine Abhängigkeitserkrankung, auszuschließen (Leitlinie Demenzen 2016). Durch kognitive Kurztests wie etwa dem *Mini-Mental-Status-Test* (MMST) oder der *Montreal Cognitive Assessment-Test* (MoCA) kann zusätzlich eine schnelle, orientierende Einschätzung der kognitiven Verfassung des Patienten erfolgen (Folstein et al. 1975; Nasreddine et al. 2005). Bei entsprechendem klinischem Verdacht sollte auch eine laborchemische Basisuntersuchung des Blutserums und –plasmas erfolgen, um etwaige reversible Ursachen einer dementiellen Symptomatik, wie etwa Elektrolytstörungen, Hypovitaminosen oder Endokrinopathien, aufzudecken (Leitlinie Demenzen 2016). Weiterführende Analysen des *liquor cerebrospinalis* zeigen bei AD-Patienten typischerweise eine Verminderung der A $\beta$ <sub>42</sub>-Fraktion unter Anstieg der Konzentration des (Phospho-)-Tau-Proteins (Pais et al. 2020). Zur ätiologischen Differenzierung so-

wie zum Ausschluss weiterer potenziell behandelbarer Ursachen einer Demenz, beispielsweise ein subdurales Hämatom, ein Tumorleiden oder ein Normaldruckhydrozephalus, kann ergänzend eine zerebrale Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie oder Computertomographie (CT) erfolgen (Leitlinie Demenzen 2016). In den bildgebenden Verfahren zeigt sich bei der AD eine typische progrediente Gehirnatrophie vor allem im Bereich des Hippocampus sowie des medialen Temporallappens (Zakzanis et al. 2003). Nach der Leitlinie für Demenzen lässt eine bloße Betrachtung der zerebralen Bildgebung keine definitive Aussage bezüglich der Differenzierbarkeit einer AD von anderen neurodegenerativen Demenzerkrankungen zu und sollte daher stets nur in Zusammenschau mit weiteren Befunden erfolgen. Ebenfalls können nuklearmedizinische Verfahren wie eine funktionelle Messung des zerebralen Glukosemetabolismus mittels einer spezifischen Positronen-Emissionstomografie (PET) oder die Messung der zerebralen Blutperfusion durch eine Hexamethylpropylenaminoxim-Einzelphotonen-Emissions-CT bei Unsicherheiten in der Differenzialdiagnostik der Demenzformen angewandt werden; diese Spezialuntersuchungen bilden jedoch kein Werkzeug der Routinediagnostik (Leitlinie Demenzen 2016). Darüber hinaus kann, falls erforderlich, die zerebrale Amyloidbelastung mithilfe diverser Tracer durch ein Amyloid-PET *in vivo* approximativ dargestellt werden (Clark et al. 2011).

### 1.5.3 Therapie

Auch gegenwärtig liegen für die AD noch keine kurativen Behandlungsmöglichkeiten vor. Die von der DPGNN zusammen mit der DGN herausgegebene S3-Leitlinie „Demenzen“ beschränkt sich in ihren Ausführungen ebenfalls lediglich auf rein symptomatische Therapieansätze, welche sich auf eine pharmakologische Behandlung sowie psychosoziale Interventionen stützen (Leitlinie Demenzen 2016).

Unter psychosozialen Interventionen werden zum einen kognitive Verfahren verstanden, welche wesentliche kognitive Funktionen wie Gedächtnis, Aufmerksamkeit und Sprache aktivieren sollen, zum anderen aber auch individuelle ergotherapeutische Maßnahmen, die unter Integration der Bezugspersonen zum Erhalt der Alltagsfunktionen beitragen können (Leitlinie Demenzen 2016). Ebenfalls konnten in der Vergangenheit positive Effekte durch regelmäßige körperliche Aktivität auf die Fähigkeiten zur Alltagsbewältigung beschrieben werden (Rolland et al. 2007).

In Bezug auf die medikamentöse Therapie verweist die genannte S3-Leitlinie insbesondere auf zwei Substanzklassen: Acetylcholinesterase (AChE)-Inhibitoren sowie N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Antagonisten (Leitlinie Demenzen 2016). Die AChE-Inhibitoren, von denen Donepezil, Galantamin und Rivastigmin zur Behandlung der leichten bis mittelschweren AD zugelassen sind, wirken über eine Konzentrationserhöhung des Acetylcholins im synaptischen Spalt indem sie zu einem verlangsamten enzymatischen Abbau durch die Acetylcholinesterase führen (Lane et al. 2018). Die Anwendung der AChE-Hemmer, deren Wirkung



dosisabhängig ist, wirkte sich in Studien unter anderem positiv auf die Kognition, die Fähigkeiten zur Verrichtung von Alltagsaktivitäten sowie den ärztlichen Gesamteindruck des Patienten aus (Leitlinie Demenzen 2016). Zwischen den einzelnen zugelassenen Wirkstoffen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Effektivität nachgewiesen werden (Birks 2006). Der nichtkompetitive NMDA-Antagonist Memantin ist hingegen zur Behandlung der moderaten bis schweren Form der AD zugelassen und zielt auf eine Reduktion der neurotoxischen Wirkung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat ab, ohne dessen physiologische Funktionen wesentlich zu beeinträchtigen (Lane et al. 2018). Unter anderem konnten in Metaanalysen positive Effekte einer Medikation mit Memantin auf die Symptomlast bei moderat bis schwer erkrankten AD-Patienten gezeigt werden (Winblad et al. 2007). Bei leichten AD-Fällen zeigte sich jedoch in einer anderen Metaanalyse keine signifikanten Vorteile einer Gabe von Memantin gegenüber der eines Placebos (Schneider et al. 2011). Die Evidenzlage einer additiven Therapie mit Memantin bei moderat bis schwer erkrankten AD-Patienten, welche bereits eine Behandlung mit einem AChE-Hemmer erhalten, ist schwach (Schmidt et al. 2015). Weitere Substanzen wie beispielsweise Ginkgo Biloba, Vitamin E oder auch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) sind in ihrer Wirksamkeit unzulänglich belegt und werden daher seitens der S3-Leitlinie „Demenzen“ aktuell nicht empfohlen (Leitlinie Demenzen 2016).

## 1.6 Neuropathologische Merkmale

Betrachtet man die Gehirne von AD-Patienten unter histologischen Gesichtspunkten, so lassen sich diverse charakteristische histopathologische Merkmale dieser Erkrankung finden. Es zeigen sich im fortgeschrittenen Krankheitsprozess unter anderem extrazelluläre A $\beta$ -Ablagerungen, intrazelluläre NFT aus Tau-Protein, ausgeprägte Nervenzellverluste sowie Entzündungsreaktionen, welche die Symptomlast bedingen können (siehe Absatz 1.5.1). Im Folgenden soll auf die genannten Charakteristika in kurzer Form eingegangen werden.

### 1.6.1 Amyloid-Plaques und zerebrale Amyloidangiopathie

Die Ablagerung von A $\beta$  in Form von extrazellulären Amyloid-Plaques stellt eine der wesentlichen charakteristischen Veränderungen in den Gehirnen von AD-Patienten dar. Diese A $\beta$ -Peptide entstehen durch die enzymatische Prozessierung des *amyloid precursor proteins* (APP) (siehe Absatz 1.7.2). Bedingt durch eine höhere Fibrillierungsrate sowie die schlechtere Löslichkeit ist A $\beta_{42}$  die häufigste A $\beta$ -Variante innerhalb der Plaques (Serrano-Pozo et al. 2011a). Es werden im Wesentlichen aufgrund ihrer Morphologie zwei Formen der senilen Amyloid-Plaques unterschieden: Neuritische Plaques, die als eine Untergruppe der „dense-core“-Plaques betrachtet werden können, sowie diffuse Plaques (DeTure und Dickson 2019; Dickson 1997).

Die neuritischen Plaques, welche in ihrem Durchmesser zwischen 10 bis >120  $\mu$ m variieren (Selkoe 2001), bestehen aus hoch aggregiertem, filamentärem A $\beta$  und können durch ihre  $\beta$ -

Faltblattstruktur mittels Kongorot oder Thioflavin-S angefärbt werden (Serrano-Pozo et al. 2011a). In ihrer unmittelbaren Nähe lassen sich häufig zahlreiche degenerierte Neuriten sowie eine ausgeprägte Astro- sowie Mikrogliose finden (Holtzman et al. 2011). Die diffusen Plaques können hingegen eine Größe von 50  $\mu\text{m}$  bis zu einigen hundert  $\mu\text{m}$  aufweisen und bestehen aus weniger aggregiertem, nicht-fibrillärem A $\beta$  (Holtzman et al. 2011; Selkoe 2001). Bislang ist nicht geklärt, ob diese diffusen Ablagerungen, welche teils auch in gesunden älteren Individuen gefunden werden konnten (Price et al. 1991), einen Teil des natürlichen Alterungsprozesses bilden oder als eine Art Vorläufer der neuritischen A $\beta$ -Plaques angesehen werden können (DeTure und Dickson 2019). Nach Thal et al. (2006) beginnt die Bildung der senilen Plaques im Neokortex und breitet sich dann hierarchisch auf allokortikale Bereiche und in der Folge auf Basalganglien, Thalamus sowie Hypothalamus aus. In der vorletzten Phase sind sowohl Mittelhirn als auch die Medulla oblongata betroffen, ehe sich die Pathologie zuletzt im Pons- und Kleinhirnareal fortsetzt (Thal et al. 2006).

Neben den extrazellulären Plaques im Hirnparenchym lagern sich bei rund 85 – 95% der AD-Patienten die A $\beta$ -Peptide auch im zerebralen Gefäßsystem ab (DeTure und Dickson 2019). Diese in ihrer Gesamtheit als zerebrale Amyloidangiopathie (*cerebral amyloid angiopathy*, CAA) bezeichneten A $\beta$ -Ablagerungen bestehen im Gegensatz zu den senilen Amyloid-Plaques vorwiegend aus A $\beta_{40}$  und können bei ausgeprägter Gefäßbeteiligung unter anderem zu lobären Hämorrhagien führen (Perl 2010).

### 1.6.2 Neurofibrillenbündel

Ein weiteres wesentliches histopathologisches Merkmal bilden die bereits durch Alois Alzheimer im Jahre 1907 andeutungsweise beschriebenen intrazellulären NFT (Alzheimer 1907; Alzheimer et al. 1995). Diese setzen sich maßgeblich aus gepaarten helikalen Filamenten (*paired helical filaments*, PHF) zusammen, welche sich aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bilden können (Kidd 1963; Wisniewski et al. 1976). Das Tau-Protein, welches in Nervenzellen produziert wird und auch in Gliazellen vorkommt, trägt physiologischerweise unter anderem zur Zusammensetzung sowie Stabilität des neuronalen Transportmechanismen beteiligten Mikrotubuli-Systems bei, indem es an das Tubulin bindet (Holtzman et al. 2011; Weingarten et al. 1975). In der Pathogenese der AD kommt es zu einer ausgeprägten Hyperphosphorylierung dieses Tau-Proteins, die zu einer reduzierten Bindungsfähigkeit an das Mikrotubuli-System führt, sodass sich folglich das hyperphosphorylierte Tau zu PHF zusammenlagern kann (Holtzman et al. 2011; Johnson und Jenkins 1999). Im Gegensatz zur Ausprägung der A $\beta$ -Ablagerungen korreliert die Menge sowie die Verteilung der NFT besser mit dem klinischen Schweregrad der Demenzerkrankung (Serrano-Pozo et al. 2011a). Dieses chronologisch-topographische Verteilungsmuster lässt sich in sechs Stadien unterteilen und skizziert den klinischen Verlauf der AD (Braak und Braak 1991).

### 1.6.3 Atrophie und Nervenzellverlust

Neben A $\beta$ -Ablagerungen und NFT stellen die Gehirnatrophie sowie auftretende Neuronenverluste weitere anerkannte Charakteristika des Morbus Alzheimer dar. Unter makroskopischen Gesichtspunkten zeigt sich die Atrophie des Hirngewebes primär im frontotemporalen Assoziationskortex, wobei zumeist der primäre motorische Kortex sowie sensorische und visuelle Areale ausgespart werden (Perl 2010). Dadurch erscheinen die lateralen Ventrikel des Gehirns, insbesondere deren temporale Hörner, verhältnismäßig dilatiert (Serrano-Pozo et al. 2011a). Dieses stereotype Muster kann im Krankheitsverlauf der AD auch mithilfe magnetresonanztomographischer Verfahren dargestellt werden (Dickerson et al. 2009; Dickerson et al. 2011). Auf mikroskopischer Ebene betrifft die Neurodegeneration vor allem die Schicht II des entorhinalen Kortex (EK), die Pyramidenzellschicht des Hippocampus sowie weitere Areale des temporalen, parietalen sowie frontalen Neokortex (Holtzman et al. 2011). West et al. (1994) konnten bereits durch stereologische Analysen eine Differenzierung zwischen gesunden und an AD erkrankten Individuen anhand der ermittelten Neuronenzahl in der CA1 (*cornu ammonis*)-Region des Hippocampus treffen, wobei die AD-Erkrankten signifikant weniger Nervenzellen in diesem Bereich aufwiesen. Weitere stereologische Analysen zeigten bereits bei Patienten im Frühstadium der AD einen ausgeprägten Nervenzellverlust im EK (Gomez-Isla et al. 1996a), wohingegen in der CA1-Region sowie in weiteren Bereichen des Hippocampus bei präklinischen AD-Erkrankten noch keine signifikante Neurodegeneration nachzuweisen war (West et al. 2004). Das kortikale Verteilungsmuster der Neurodegeneration gleicht dem der NFT, jedoch übersteigt der Ausprägungsgrad des Nervenzellverlustes die Menge an NFT um ein Vielfaches und scheint ein besseres Korrelat für die kognitiven Defizite der Patienten darzustellen (DeTure und Dickson 2019; Gomez-Isla et al. 1997). Auch gegenwärtig werden mögliche Auslöser der Neurodegeneration sowie Atrophie des Hirngewebes weiterhin kontrovers diskutiert. Neben der kortikalen Belastung mit hyperphosphoryliertem Tau-Protein in Form der NFT werden auch intrazelluläre A $\beta$ -Ablagerungen als kausaler Faktor der AD-Pathologie vermutet (TA Bayer und Wirths 2010).

Einen weiteren Erklärungsansatz für die kennzeichnende Gehirnatrophie bilden ausgeprägte Synapsenverluste, die zeitlich gesehen noch vor den Nervenzellverlusten in den Gehirnen von AD-Erkrankten einsetzen und diese sogar quantitativ übertreffen (Serrano-Pozo et al. 2011a). Nach Terry et al. (1991) besteht zwischen dem Verlust an Synapsen und den assoziierten kognitiven Einschränkungen sogar eine Korrelation auf einem höheren Signifikanzniveau als sie etwa zu Neurodegeneration oder Tau-Pathologie besteht. Im progredienten Krankheitsverlauf kommt es neben der mengenmäßigen Reduktion auch zu einer reduzierten Dichte der Synapsen, welche jedoch scheinbar durch eine Größenzunahme der verbliebenen Synapsen kompensiert wird (DeTure und Dickson 2019; Scheff und Price 1993).

#### 1.6.4 Neuroinflammation

In den Gehirnen von AD-Patienten bilden geschädigte Nervenzellen, A $\beta$ -Ablagerungen sowie NFT den Ausgangspunkt für inflammatorische Prozesse, welche unter anderem mit einer Aktivierung von Komplementfaktoren, Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen sowie weiteren Entzündungsmediatoren einhergehen (Akiyama et al. 2000). Diese entzündlichen Prozesse konnten unter anderem auch in zahlreichen transgenen AD-Mausmodellen bestätigt werden (Saito und Saido 2018). In unmittelbarer Nähe zu A $\beta$ -Ablagerungen konnte eine reaktive Mikro- sowie Astroglie nachgewiesen werden, was auf eine entzündungsfördernde Rolle des A $\beta$  schließen lässt (Itagaki et al. 1989; Pike et al. 1995a). Diese Glieose scheint im Gegensatz zur Amyloidlast linear mit dem Krankheitsverlauf zuzunehmen und korreliert signifikant mit dem Ausprägungsgrad der NFT (Serrano-Pozo et al. 2011b). Dabei lässt sich die Astroglieose mit einem frühen Krankheitsstadium der AD assoziieren, wohingegen eine ausgeprägte Mikrogliaaktivierung eher im späteren Verlauf der Erkrankung aufzutreten scheint (Chun et al. 2018; Jack et al. 2010). Insgesamt sind auch noch gegenwärtig die genauen Funktionen der in der Pathogenese der AD auftretenden Entzündungsprozesse zu weiten Teilen unklar; so stehen beispielsweise der Neurodegeneration auch neuroprotektive Aspekte der Glieose gegenüber (Wyss-Coray und Rogers 2012).

#### 1.6.5 Neurogenese

Auch in den Gehirnen von älteren Individuen kommt es entgegen früherer Annahmen zu einer kontinuierlichen Neubildung von Nervenzellen aus bestimmten Stamm- bzw. Vorläuferzellen (X Jin 2016). Dieser Prozess wird als Neurogenese bezeichnet und wurde erstmals von Altman und Das (1965) durch Zufall in adulten Ratten entdeckt. Bei erwachsenen Säugetieren konnte die adulte Neurogenese vor allem in zwei Regionen des zentralen Nervensystems (ZNS) nachgewiesen werden: in der subventrikulären Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel sowie in der subgranulären Zone (SGZ) des *Gyrus dentatus* (GD) der Hippocampusformation (LC Abbott und Nigussie 2020). Die neuronalen Vorläuferzellen aus der SVZ können über den rostralen migratorischen Strom in den Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) migrieren und dort zu lokalen Interneuronen differenzieren (Luskin 1993). Demgegenüber migrieren die Vorläuferzellen aus der SGZ des GD in die Körnerzellschicht (*Stratum granulare*) und differenzieren dort zu Neuronen (Eriksson et al. 1998; K Jin et al. 2004b). Insgesamt stellt die hippocampale Neurogenese kein simples Ereignis dar, sondern ist vielmehr als ein komplexer, mehrstufiger Prozess aus verschiedenen Phasen zu verstehen (Kempermann et al. 2015), der maßgeblich an der neuronalen Plastizität sowie bei Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligt ist (Hollands et al. 2016). So lassen sich Defizite im Lernverhalten oder Gedächtnisstörungen, wie sie etwa bei der AD auftreten können, zumindest teilweise auf eine beeinträchtigte adulte Neurogenese zurückführen (Demars et al. 2010; Lazarov und Marr 2010). Insbesondere eine Dysfunktion von Presenilin-1 (PS-1) und eine gestörte Prozessierung des APP sowie die toxischen Effekte von hyperphosphoryliertem Tau und A $\beta$  scheinen

zu einer beeinträchtigten Neurogeneserate beizutragen (Lazarov et al. 2010). Diese Beeinträchtigungen der Neurogenese konnten in der Vergangenheit auch in diversen transgenen AD-Mausmodellen als gemeinsames Merkmal beschrieben werden (Wirh's 2017). Unter anderem werden einer gesteigerten körperlichen Aktivität sowie einem Lebensumfeld mit vielfältigen stimulatorischen Reizen positive Einflüsse auf die Neurogeneserate attestiert (Lazarov et al. 2010). Ein deutlicher Effekt durch ausgeprägte physische Aktivität konnte auch durch einige tierexperimentelle Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Gerberding et al. 2019; Hüttenrauch et al. 2016). Die adulte Neurogenese gilt somit trotz kontroverser Diskussionen aufgrund ihrer vielschichtigen Modulationsmöglichkeiten als ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige therapeutische Strategien in der Alzheimertherapie (Hollands et al. 2016).

## 1.7 Pathomechanismen des Morbus Alzheimer

Bei der Pathogenese der Alzheimererkrankung spielen Ablagerungen des A $\beta$ -Proteins eine bedeutende Rolle. Mitte der 1980er-Jahre konnten diese A $\beta$ -Ablagerungen in zerebralen Amyloidangiopathien (Glenn'er und Wong 1984b) sowie in Amyloidplaqueformationen (Masters et al. 1985b) bei Alzheimer- und Down-Syndrom-Patienten nachgewiesen werden. Bereits einige Jahre später zeigten Tanzi et al. (1987), dass diese A $\beta$ -Peptide aus einem größeren Vorläuferprotein, dem APP, hervorgehen mussten.

### 1.7.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein

Das APP ist ein integrales Typ-1-Membranprotein, welches seinen Genlocus auf Chromosom 21 hat (Kang et al. 1987). Es besteht aus einem großen, extrazellulären Amino(N)-Terminus, einer hydrophoben transmembranären Domäne und dem kurzen intrazellulär liegenden Carboxy(C)-Terminus (Dyrks et al. 1988; Kang et al. 1987). Durch alternatives Spleißen können acht verschiedene Isoformen des APP entstehen, die sich in ihrer Anzahl an Aminosäuren voneinander unterscheiden (Sandbrink et al. 1996). Die drei APP-Isoformen APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub> und APP<sub>770</sub> kommen am häufigsten vor, davon APP<sub>695</sub> vorwiegend im ZNS (O'Brien und Wong 2011). Auch wenn viele Funktionen des APP noch ungeklärt sind, wird dem Vorläuferprotein in der Literatur unter anderem die Funktion eines Oberflächenrezeptors, die Beteiligung bei der Signaltransduktion und axonalen Transportmechanismen, der Synaptogenese und der Zelladhäsion sowie eine Rolle im Calciumstoffwechsel zugeschrieben (Zheng und Koo 2006, 2011).

### 1.7.2 Die APP-Prozessierung

Grundlegend werden zwei Wege der APP-Prozessierung unterschieden: der amyloidogene Weg, bei dem es zur Bildung des A $\beta$ -Proteins kommt, und der nicht-amyloidogene Weg, welcher die A $\beta$ -Entstehung verhindert (Haass et al. 2012).

### 1.7.2.1 Der nicht-amyloidogene Weg

Im nicht-amyloidogenen Weg wird das Vorläuferprotein innerhalb der A $\beta$ -Region zwischen den Aminosäuren Lysin an Position 16 und Leucin an Position 17 durch eine  $\alpha$ -Sekretase gespalten (Esch et al. 1990; Sisodia et al. 1990; R Wang et al. 1991). Die  $\alpha$ -Sekretase ist eine an die Plasmamembran gebundene Protease (Sisodia 1992), deren Funktion durch Metalloproteasen aus der Gruppe der *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM) erfüllt werden. Dazu zählen unter anderem ADAM9, ADAM10, ADAM17 (auch als *tumour necrosis factor- $\alpha$  convertase* (TACE) bezeichnet) und ADAM19 (Allinson et al. 2003; Haass et al. 2012). Insbesondere ADAM10, welche vor allem in Neuronen vorhanden ist, spielt eine tragende Rolle im Spaltungsvorgang. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass ein *knockdown* der ADAM10 zu einer kompletten Suppression der  $\alpha$ -Sekretase vermittelten Spaltung führt (PH Kuhn et al. 2010). Bei Überexpression der ADAM10 kommt es hingegen zu einer Erhöhung der *secreted amyloid precursor protein a* (sAPP $\alpha$ )-Konzentration und einer reduzierten Bildung von A $\beta$  (Postina et al. 2004).

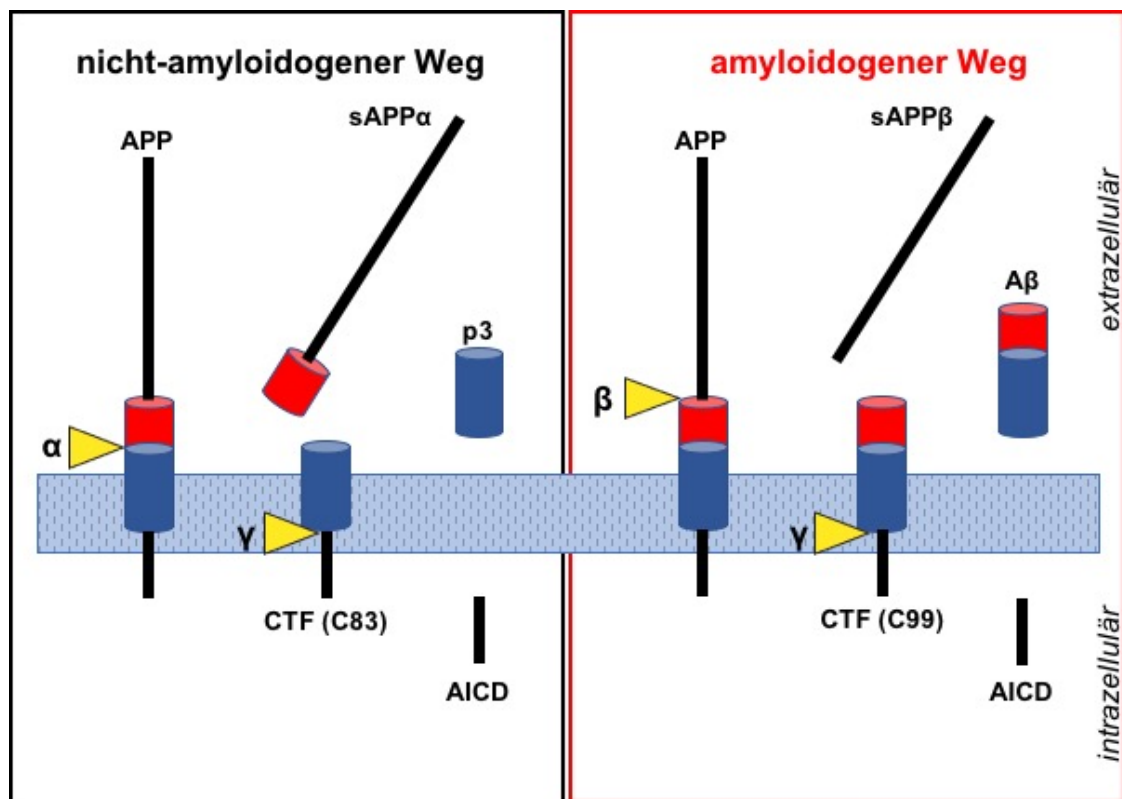
Durch die Spaltung des APP entsteht ein großes, lösliches N-terminales Fragment sAPP $\alpha$  sowie ein kleineres aus 83 Aminosäuren bestehendes, membrangebundenes C-terminales Fragment (CTF) C83, welches nachfolgend durch eine  $\gamma$ -Sekretase in das lösliche Fragment p3 und die APP intrazelluläre Domäne (AICD) gespalten wird (Haass et al. 2012). Während für das sAPP $\alpha$  eine Reihe neuroprotektiver Effekte, wie etwa die Förderung des Neuritenwachstums und der Synaptogenese sowie der synaptischen Plastizität (Furukawa et al. 1996; Mattson 1997) bekannt sind, ist die genaue Funktion des löslichen p3 bislang unbekannt (Chow et al. 2010). Der im Zytoplasma verbleibenden AICD wird unter anderem eine Rolle als Transkriptionsfaktor sowie daraus folgend weitere an der Pathogenese des Morbus Alzheimer beteiligte Funktionen zugeschrieben (Pardossi-Piquard und Checler 2012).

### 1.7.2.2 Der amyloidogene Weg

Im amyloidogenen Weg entstehen unter Prozessierung des APP durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen die toxischen A $\beta$ -Peptide (Haass et al. 2012). Zuerst erfolgt die Spaltung durch eine  $\beta$ -Sekretase, maßgeblich vermittelt durch das  *$\beta$ -site APP cleavage enzyme 1* (BACE1), wodurch das lösliche N-terminale Fragment *secreted amyloid precursor protein  $\beta$*  (sAPP $\beta$ ) sowie ein 99 Aminosäuren langes, membrangebundenes CTF C99 entsteht (Vassar et al. 1999; Zhang et al. 2012). Im Gegensatz zum nicht-amyloidogenen Weg erfolgt die Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase nicht innerhalb der A $\beta$ -Region, sondern weiter oberhalb ebendieser. Das membrangebundene C99 wird nachfolgend durch  $\gamma$ -Sekretaseaktivität gespalten, wodurch die intrazelluläre AICD sowie verschiedene A $\beta$ -Peptide, die in ihrer Länge zwischen 37 bis 42 Aminosäuren variieren können, entstehen (Haass et al. 2012).

Die  $\gamma$ -Sekretase, welche auch im nicht-amyloidogenen Weg das CTF spaltet, ist ein aus vier Untereinheiten zusammengesetzter Membranproteinkomplex: PS-1 oder PS-2 (Presenilin-

2), Nicastrin, *anterior pharynx-defective-1* (APH-1) und *presenilin enhancer-2* (PEN-2) (Edbauer et al. 2003; Kimberly et al. 2003; Steiner et al. 2018).



**Abbildung 1: Die APP-Prozessierung.** Im nicht-amyloidogenen Weg (**links**) erfolgt eine durch  $\alpha$ -Sekretaseaktivität vermittelte Spaltung des APP-Vorläuferproteins innerhalb der A $\beta$ -Region, wodurch die Spaltprodukte sAPP $\alpha$  und das membrangebundene C83 entstehen. Dieses wird durch eine  $\gamma$ -Sekretase in das lösliche Fragment p3 und die intrazelluläre Domäne AICD gespalten. Es entsteht kein A $\beta$ . Auf dem amyloidogenem Weg (**rechts**) wird das APP-Vorläuferprotein hingegen durch eine  $\beta$ -Sekretase oberhalb der A $\beta$ -Region gespalten. Es entstehen das lösliche N-terminale Fragment sAPP $\beta$  und das membrangebundene C99, welches nachfolgend durch die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase in AICD sowie das pathogenetisch bedeutsame A $\beta$  gespalten wird. Abbildung erstellt nach Haass et al. (2012).

### 1.7.3 Die Amyloidhypothese

Ausgehend von den bei Alzheimer- sowie Down-Syndrom-Patienten beschriebenen A $\beta$ -Ablagerungen entwickelten J Hardy und Allsop im Jahre 1991 eine Hypothese, welche als Erklärungsansatz der zugrundeliegenden Pathomechanismen der Alzheimererkrankung dienen sollte. Demnach seien ein veränderter APP-Metabolismus mit nachfolgend gesteigerter Bildung sowie der extrazellulären Ablagerung von A $\beta$  der zentrale Ausgangspunkt in der Pathogenese des Morbus Alzheimer (J Hardy und Allsop 1991). Die Formation von A $\beta$ -Plaques stehe im zeitlichen Kontext noch vor den anderen mit AD assoziierten pathologischen Prozessen und bedinge sogar die Entwicklung von NFT, Nervenzellverlusten, vaskulären Schäden und die klinische Ausprägung der Demenz (J Hardy und Allsop 1991; JA Hardy und Higgins 1992).

Diese Hypothese wird unter anderem dadurch gestützt, dass Individuen mit einer autosomal-dominant vererbten Mutation in Genen, welche das APP-Protein kodieren, sowie Trägern einer Mutation in PS-1 oder PS-2, wie sie bei der familiären Form der AD (fAD) vorliegen können, über eine damit verbundene Erhöhung der A $\beta$ -Konzentration häufiger die Alzheimer-typischen Pathologien entwickeln (Rademakers und Rovelet-Lecrux 2009; Ricciarelli und Fedele 2017). Bereits in der Vergangenheit konnten in Mausmodellen, welche Mutationen für die fAD aufwiesen, altersabhängige Veränderungen wie Amyloidablagerungen, Neuroinflammation oder zerebrale Amyloidangiopathien, wie sie auch bei der fAD vorkommen, reproduziert werden (Radde et al. 2008). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit Down-Syndrom, bei denen eine Triplikation des Chromosoms 21 vorliegt, auf dem sich unter anderem auch der Genlocus des APP befindet (Kang et al. 1987), vermehrt an einer AD erkranken (Glennner und Wong 1984a; Pimplikar 2009). Dies ist auf die damit einhergehende Erhöhung der Gendosis des APP-Proteins sowie der daraus resultierenden vermehrten A $\beta$ -Produktion zurückzuführen (Pimplikar 2009).

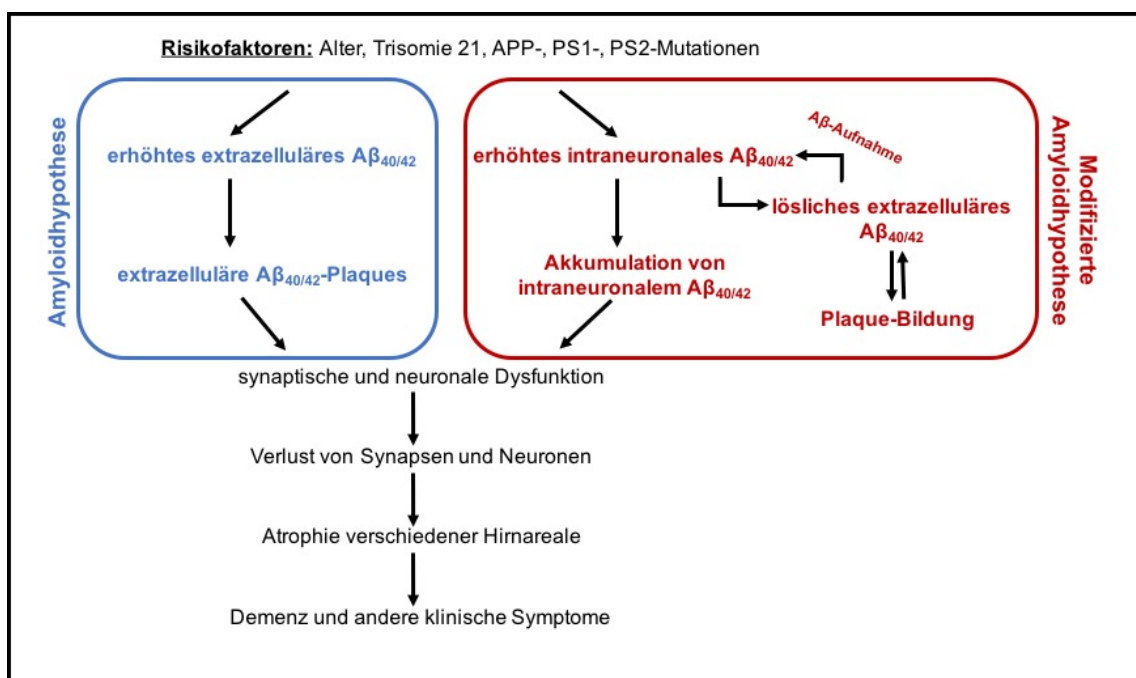
Der ursprünglich von J Hardy und Allsop (1991) proklamierten Amyloidhypothese stehen jedoch auch diverse Argumente entgegen. So lässt sich beispielsweise die Ausprägung der A $\beta$ -Ablagerungen nicht mit den Nervenzellverlusten oder kognitiven Einschränkungen eines Individuums korrelieren (Ricciarelli und Fedele 2017; Terry et al. 1991; Walsh und Selkoe 2007). Auch kann bei einer Belastung mit A $\beta$ -Plaques, welche in geringerem Ausmaß auch während des normalen Alterungsprozesses eines Individuums auftreten kann, die Kognition völlig uneingeschränkt sein (Dickson et al. 1992; Pimplikar 2009). In einigen experimentellen Studien konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass kognitive Einschränkungen sowie neuropathologische Veränderungen nachgewiesen werden konnten, noch bevor extrazelluläre Plaques auftraten (Lesne et al. 2008; Walsh und Selkoe 2007). Unter anderem Braak und Braak (1991) postulierten hingegen bereits in den 1990er-Jahren, dass NFT zum einen noch vor den beschriebenen A $\beta$ -Ablagerungen auftreten und zum anderen die Menge an NFT wesentlich besser mit dem klinischen Stadium der Erkrankung korrelieren würde als der A $\beta$ -*Plaque*load (Wirhth et al. 2004).

#### 1.7.4 Die modifizierte Amyloidhypothese

Als weiterer Erklärungsansatz der pathophysiologischen Krankheitsprozesse entwickelte sich eine modifizierte Amyloidhypothese, welche ihren Fokus insbesondere auf das bereits durch Masters et al. (1985a) vorbeschriebene intraneuronale A $\beta$  legt (Wirhth et al. 2004). Diese intrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen scheinen als besonders frühes Ereignis der Formation von NFT sowie den extrazellulären Amyloidplaques voranzugehen (Fernandez-Vizarra et al. 2004; Wirhth et al. 2001). Ferner konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Immunreaktivität gegen dieses intraneuronale A $\beta_{42}$ -Protein unter der Zunahme von kognitiven Einschränkungen sowie zunehmender Ausprägung der extrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen deutlich abnimmt (Gouras et al. 2000). Ähnliches konnte im Folgenden auch im Altersverlauf von Patienten mit Down-Syndrom bestätigt werden (Gyure et al. 2001; C Mori et al. 2002).



Diese A $\beta$ -Peptide, deren intraneuronale Produktion durch Risikofaktoren wie steigendes Lebensalter, Vorliegen einer Trisomie 21 sowie durch diverse Mutationen in APP, PS-1 oder PS-2 zusätzlich erhöht werden, können folglich intrazellulär akkumulieren oder auch als lösliches A $\beta$  nach extrazellulär sekretiert werden und die Amyloidplaques bilden (Wirhth et al. 2004). Ebenfalls kann durch bestimmte Transportmechanismen eine erneute Aufnahme des aus den Amyloidplaques freigesetzten A $\beta$  nach intrazellulär erfolgen, sodass den Plaques als dynamische Strukturen eine Art Reservoirfunktion zukommt (LaFerla et al. 2007; Wirhth et al. 2004). Lösliche A $\beta$ -Oligomere haben demnach in der Pathogenese der AD eine Schlüsselrolle inne und wurden in ihrer Wichtigkeit zugunsten der als ursprünglich für die pathologischen Veränderungen als verantwortlich angesehenen Amyloidplaques in der Vergangenheit lange vernachlässigt (Cline et al. 2018).



**Abbildung 2: Vergleich der beiden Amyloidhypothesen.** Im Gegensatz zur klassischen Amyloidhypothese (blau) legt die modifizierte Amyloidhypothese (rot) ihren Fokus auf das intraneuronale A $\beta$ , dessen Formation nach neueren Erkenntnissen ein besonders frühes Ereignis in der Pathogenese des Morbus Alzheimer darstellt. Die genannten Risikofaktoren können die A $\beta$ -Produktion zusätzlich erhöhen, was letztendlich zu einer Akkumulation des intrazellulären A $\beta$  führt. Allerdings kann lösliches A $\beta$  auch nach extrazellulär sekretiert werden und dort Amyloidplaques bilden. Diesen kommt als dynamischen Strukturen eine Art Reservoirfunktion zu, da aus den Plaques freigesetztes A $\beta$  erneut nach intrazellulär aufgenommen werden kann. Beide Amyloidhypothesen münden in einer synaptischen und neuronalen Dysfunktion, welche den Verlust von Synapsen und Neuronen bedingt und über die Atrophie verschiedener Hirnareale zum Vollbild der Demenz führt. Erstellt nach Wirhth et al. (2004).

### 1.7.5 Die A $\beta$ -Varianten und die physiologischen Funktionen des A $\beta$

Die in Absatz 1.7.3 beschriebene Amyloidhypothese stellt das vermehrte Vorhandensein des Volllängen-A $\beta_{42}$ -Peptids sowie das A $\beta_{40}$ /A $\beta_{42}$ -Verhältnis mit daraus folgender Plaqueformation ins Zentrum der AD-Pathogenese (Dunys et al. 2018). Die Hauptvertreter dieser A $\beta$ -Volllängenpeptide sind A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$ , welche auch in Individuen ohne eine beschriebene AD unter physiologischen Bedingungen im amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretaseaktivität gebildet werden (siehe Absatz 1.7.2.2) (Haass et al. 1992). Die A $\beta_{42}$ -Variante, welche häufiger in den zerebralen Plaques bei AD vorkommt, ist hydrophober und neigt im Gegensatz zu A $\beta_{40}$  eher zur Fibrillenbildung (LaFerla et al. 2007).

Die exakten Funktionen der A $\beta$ -Peptide im Stoffwechsel bleiben aktuell noch weitestgehend ungeklärt. Es werden dem A $\beta$  in der Literatur jedoch zahlreiche Funktionen zugeschrieben wie etwa eine gewisse antimikrobielle Aktivität, eine Unterstützung der Rekonvaleszenz nach traumatischen Hirnverletzungen, eine Abdichtungsfunktion der BHS sowie die Regulation von synaptischen Funktionen (Brothers et al. 2018). Auch positive Eigenschaften in der Suppression bzw. Wachstumshemmung von Tumoren werden diskutiert (Brothers et al. 2018).

Neben den genannten A $\beta$ -Volllängenpeptiden, die aus einer Sequenz von 40 bzw. 42 Aminosäuren zusammengesetzt sind und mit einem Aspartat-Rest an erster Position ihrer Aminosäuresequenz beginnen, wurden unter anderem auch diverse A $\beta$ -Peptidvarianten mit Veränderungen an ihrem C-Terminus beschrieben, welche in ihrer Sequenzlänge zwischen 37 bis 43 Aminosäuren variieren konnten (H Mori et al. 1992; Reinert et al. 2016). Daneben wurden bereits vor über 30 Jahren durch Masters et al. (1985b) A $\beta$ -Peptide beschrieben, welche eine Verkürzung an ihrem N-Terminus aufwiesen. Neueren Untersuchungen zufolge nehmen diese N-trunkierten A $\beta$ -Peptide einen Großteil (in der durchgeführten Analyse knapp über 70%) des Gesamtanteils an A $\beta$ -Varianten in Gehirnen von AD-Patienten ein (Wildburger et al. 2017). *In vitro* Experimente konnten darüber hinaus zeigen, dass diese Verkürzungen am N-Terminus mit einer erhöhten Aggregationsneigung sowie dadurch bedingt mit einer erhöhten Stabilität der A $\beta$ -Peptide einhergingen, welche deren Abbau erschwerte (Pike et al. 1995b). In Bezug auf die Entstehung der N-trunkierten A $\beta$ -Varianten werden unterschiedliche enzymatische Aktivitäten einiger Proteasen (u.a. BACE1, Nephilysin und Mepri $\beta$ ) mit unterschiedlichen Angriffspunkten diskutiert (TA Bayer und Wirths 2014). Aber auch posttranslationale Modifikationen wie Oxydierung, Phosphorylierung, Nitrierung, Racemisierung, Isomerisierung, Pyroglutamylierung sowie Glykosylierung sollen zur Vielfalt der A $\beta$ -Peptide beitragen (Kummer und Heneka 2014).

Portelius et al. (2010) konnten nachweisen, dass A $\beta_{1-42}$ , A $\beta_{pE3-42}$ , A $\beta_{4-42}$  und A $\beta_{1-40}$  die hauptsächlich im Gehirn von AD-Patienten vorkommenden A $\beta$ -Varianten darstellen. Dabei konnten in Bezug auf die Verteilung der A $\beta$ -Subtypen keine wesentlichen Unterschiede zwischen der fAD oder der sAD festgestellt werden (Portelius et al. 2010). Im Folgenden soll nun

näher auf die in den A $\beta$ -Ablagerungen von AD-Patienten dominierenden A $\beta$ -Varianten A $\beta_{pE3-42}$  und A $\beta_{4-42}$  sowie das allgemeine Aggregationsverhalten eingegangen werden.

#### 1.7.5.1 Das Amyloid- $\beta_{pE3-42}$

Das A $\beta_{pE3-42}$ -Peptid beginnt im Gegensatz zu den Volllängenpeptiden mit einem Pyroglutamarest an der dritten Position seines N-Terminus und wurde erstmals durch H Mori et al. (1992) massenspektrometrisch nachgewiesen.

Die Entstehung des A $\beta_{pE3-42}$  ist ein mehrstufiger Prozess, bei welchem primär die ersten beiden Aminosäuren der Aminosäuresequenz entfernt werden müssen, um den Glutamarest an der dritten Position des A $\beta$ -Peptids freizulegen (Jawhar et al. 2011). Es wird vermutet, dass dieser Schritt durch die Aminopeptidase A katalysiert wird (Sevally et al. 2009). Unter der Enzymaktivität der Glutaminylcyclase (QC) kann durch eine Dehydratation von Glutamat das Pyroglutamat gebildet werden (Jawhar et al. 2011; Schilling et al. 2004). Unterstützend konnte sowohl *in vitro* (Cynis et al. 2008) als auch *in vivo* (Schilling et al. 2008) gezeigt werden, dass eine Reduktion der QC zu einer reduzierten Bildung von A $\beta_{pE3-42}$  führt (Kummer und Heneka 2014).

Nach Saido et al. (1995) sollten die A $\beta_{pE3}$ -Peptidvarianten mindestens in äquivalenter, wenn nicht sogar in größerer Menge als die A $\beta$ -Volllängenpeptide in Plaques von AD-Patienten vorliegen und im Krankheitsverlauf die Ablagerung der A $\beta_{pE3}$ -Peptide noch vor der Ablagerung der A $\beta_{1-x}$ -Varianten beginnen. Ferner scheint das Verhältnis von A $\beta_{pE3}$ - zu A $\beta_{1-x}$ -Peptiden in einem inversen Verhältnis zueinander zu stehen, wie unter anderem in transgenen APP/PS1KI-Mäusen gezeigt werden konnte (Jawhar et al. 2011; Wirths et al. 2010). Insgesamt wird A $\beta_{pE3}$  im Vergleich zu den A $\beta$ -Volllängenpeptiden eine höhere Stabilität, verbunden mit einer ausgeprägten Aggregationsneigung sowie eine erhöhte Toxizität zugesprochen (Wirths et al. 2010).

#### 1.7.5.2 Das Amyloid- $\beta_{4-42}$

Ein weiterer Vertreter der am N-Terminus verkürzten A $\beta$ -Peptide stellt das A $\beta_{4-42}$  dar, welches bereits Mitte der 1980er Jahre von Masters et al. (1985b) beschrieben wurde und mit einem Phenylalanin an vierter Position der Aminosäuresequenz beginnt. Aktuell sind der genaue Entstehungsprozess der A $\beta_{4-42}$ -Variante sowie die hierbei potentiell verantwortlichen Enzyme noch nicht geklärt. In der Vergangenheit wurde eine Beteiligung der Metalloprotease Neprilysin (NEP), die unmittelbar das A $\beta_{1-x}$ -Peptid zwischen den Aminosäuren Glutamin und dem an vierter Position befindlichen Phenylalanin spalten sollte, diskutiert (Wirths und Zampar 2019). Eine neuere Studie hält jedoch unter anderem das Enzym *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4* (ADAMTS4), welches bei adulten Mäusen in Oligodendrozyten nachgewiesen werden konnte, für einen möglichen Erklärungsansatz für die Bildung von A $\beta_{4-x}$ -Peptiden (Walter et al. 2019).

Nach Portelius et al. (2010) stellen  $A\beta_{4-42}$  und  $A\beta_{1-42}$  die dominierenden  $A\beta$ -Fraktionen im Hippocampus- sowie Kortexbereich von AD-Patienten dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass  $A\beta_{pE3-42}$  und  $A\beta_{4-42}$  im Vergleich zu anderen  $A\beta$ -Peptiden eine stärkere Aggregationsneigung aufwiesen und gemeinsam mit  $A\beta_{1-42}$  in einer durchgeführten neuronalen Zellkultur unter den betrachteten  $A\beta$ -Varianten über die höchste Toxizität verfügten (Y Bouter et al. 2013). In weiterführenden Experimenten konnten von Y Bouter et al. (2013) bei intraventrikulärer Injektion von  $A\beta_{4-42}$ ,  $A\beta_{pE3-42}$  sowie  $A\beta_{1-42}$  signifikante Defizite im Arbeitsgedächtnis von Wildtyp (WT)-Mäusen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte sich am Tg4-42-Mausmodell eine Korrelation von ausgeprägter  $A\beta_{4-42}$ -Belastung mit Neuronenverlusten in der CA1-Region des Hippocampus und Einschränkungen des Lernverhaltens sowie des räumlichen Gedächtnisses (Y Bouter et al. 2013).

### 1.7.5.3 Das Aggregationsverhalten des $A\beta$

Die im amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung (siehe Absatz 1.7.2.2) erzeugten  $A\beta$ -Monomere können bei Überschreiten einer kritischen Konzentration, welche durch ein Ungleichgewicht zwischen deren Produktion und Abbau entstehen können, durch Selbstaggregation lösliche Dimere, Trimere oder auch größere Oligomere bilden (Walsh und Selkoe 2007). Aus diesem prä-fibrillären Zustand können die löslichen  $A\beta$ -Oligomere über Protofibrillen zu  $A\beta$ -Fibrillen, dem Hauptbestandteil der Amyloidplaques, aggregieren (Benilova et al. 2012). Zusätzlich können die gebildeten Protofibrillen simultan zurück in ihre monomeren Vorstufen dissoziieren (Grüning et al. 2013).

Über eine lange Zeit hinweg wurden die während des Aggregationsprozesses entstehenden  $A\beta$ -Fibrillen als eigentlicher Auslöser der AD-Pathologie vermutet, wohingegen aktuell jedoch angenommen wird, dass bereits die löslichen Zwischenprodukte in Form der  $A\beta$ -Oligomere ihre toxische Wirkung in einem sehr frühen Stadium der AD entfalten und ein Hauptauslöser der Erkrankung sein könnten (Verma et al. 2015). Ferner konnte gezeigt werden, dass diese löslichen Oligomere für Synapsenverluste mit verstärkter synaptischer Depression sowie für eine Inhibition der Langzeitpotenzierung verantwortlich sind (Mroczko et al. 2018). Unter anderem zeigten bereits *in vivo* Studien eine bessere Korrelation der Menge an löslichen  $A\beta$ -Oligomeren mit der Erkrankungsschwere, als es die zuvor häufig betrachteten Amyloid-Plaques taten (DaRocha-Souto et al. 2011), daher könnten diese löslichen Oligomere auch ein vielversprechendes Ziel weiterer Therapiestrategien darstellen (Hefti et al. 2013).

## 1.8 Genetik der Alzheimererkrankung

Anhand des Alters der Patienten bei Auftreten der Erkrankung kann zwischen einer „*early-onset*“-AD (EOAD) und einer „*late-onset*“-AD (LOAD) unterschieden werden (Mendez 2019). Während die EOAD bereits bei Patienten unter 65 Jahren einsetzt, setzen bei der

LOAD die ersten Erkrankungszeichen erst nach dem 65. Lebensjahr ein. Beide Erkrankungsformen können klinisch nicht genau voneinander differenziert werden, auch wenn die EOAD zumeist einen schneller progredienten Verlauf nimmt als die LOAD (Reitz und Mayeux 2014). Im Folgenden sollen die beiden Varianten etwas näher beleuchtet werden.

### 1.8.1 Die „*early-onset*“-Alzheimerdemenz

Die im jüngeren Lebensalter auftretende EOAD ist anteilig für rund 5 – 6% der gesamten Fälle von AD verantwortlich (Mendez 2019). Von diesem prozentualen Anteil können wiederum ungefähr 11% auf die fAD zurückgeführt werden, der autosomal-dominant vererbte Mutationen in APP, PS-1 oder PS-2 zugrunde liegen (Kunkle et al. 2017). Bisher konnten 289 verschiedene Mutationen in PS-1, 48 Mutationen in PS-2 sowie 58 Mutationen in APP identifiziert werden (Jia et al. 2020).

In diesem Zusammenhang wurde durch Goate et al. (1991) als erste Mutation eine Punktmutation (Valin → Isoleucin) in dem auf Chromosom 21 gelegenen APP-Gen beschrieben, welche fortan als London Mutation bezeichnet wurde. Diese Mutation in der Nähe der  $\gamma$ -Sekretase-Schnittstelle führt über eine Erhöhung der  $A\beta_{42}$ -Fraktion zu einem erhöhten  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ -Verhältnis (Suzuki et al. 1994). Andere Mutationen in der Nähe der  $\beta$ -Sekretase-Schnittstelle, wie etwa die sogenannte schwedische Mutation, können hingegen zu einer ausgeprägten Erhöhung des gesamten  $A\beta$  führen (Citron et al. 1994; Mullan et al. 1992). Des Weiteren können Mutationen innerhalb der  $A\beta$ -Domäne komplizierte Effekte auf die APP-Prozessierung haben und so durch veränderte Eigenschaften der gebildeten  $A\beta$ -Peptide beispielsweise eine erhöhte Aggregationsneigung in  $A\beta$ -Amyloidfibrillen bedingen (Tcw und Goate 2017).

Die meisten der fAD zugrundeliegenden Mutationen finden sich jedoch, wie oben bereits erwähnt, im PS-1-Gen. Insgesamt stellen die Preseniline wichtige Bestandteile eines Membranproteinkomplexes dar, welcher in seiner Gesamtheit die  $\gamma$ -Sekretase bildet und damit wesentlich an der  $A\beta$ -Produktion beteiligt ist (Steiner et al. 2018). Auftretende Mutationen in diesen Genen können demnach zu einer Beeinträchtigung der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität führen, die wiederum zu einem erhöhten Verhältnis von  $A\beta_{42}$  zu  $A\beta_{40}$  führt (Bettens et al. 2013).

### 1.8.2 Die „*late-onset*“-Alzheimerdemenz

Die Mehrheit der Alzheimer-Fälle tritt jedoch erst jenseits des 65. Lebensjahres auf und wird deshalb als LOAD bezeichnet. Dieser Form können anders als bei der fAD keine eindeutigen Mutationen attribuiert werden, weshalb sie der sAD zugerechnet wird. Auch wenn die genauen Ursachen der LOAD noch unbekannt sind, wird eine Wechselwirkung aus genetischen und umweltassoziierten Faktoren vermutet (siehe auch Absatz 1.3) (Lane et al. 2018).

Als ein bedeutender genetischer Risikofaktor konnte das  $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoprotein E (ApoE), dessen Gen sich auf Chromosom 19q13.2 befindet, identifiziert werden (Chartier-

Harlin et al. 1994; Strittmatter et al. 1993). ApoE ist ein Plasmaprotein, welches eine wesentliche Rolle im Transport von Cholesterol sowie innerhalb des allgemeinen Fettstoffwechsels einnimmt, dem aber zusätzlich sowohl Funktionen in der Immunregulation als auch die Modulation von Zellwachstum und -differenzierung zugeschrieben werden (Mahley 1988). Insgesamt werden in der Literatur drei Allelausprägungen des ApoE beschrieben:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$  (Zannis et al. 1981). Die Träger lediglich eines  $\epsilon 4$ -Allels haben im Vergleich zu Nicht- $\epsilon 4$ -Allelträgern ein doppelt bis dreifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AD, wohingegen Träger von zwei  $\epsilon 4$ -Allelen sogar ein über zwölfmal erhöhtes Risiko aufweisen (Kim et al. 2009). Des Weiteren soll das Vorhandensein des  $\epsilon 4$ -Allels auch mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert sein, wenngleich sich daraus allerdings keine Änderungen der Progressionsrate der AD ergeben (Gomez-Isla et al. 1996b). Im Gegensatz dazu ist für  $\epsilon 2$ -Allelträger ein geringeres Risiko für das Auftreten einer AD beschrieben (Corder et al. 1994).

## 1.9 Das Tg4-42-Mausmodell

In der Vergangenheit wurden bereits zahlreiche transgene Mausmodelle entwickelt, um die Pathogenese der AD-Erkrankung in ihren Zusammenhängen besser verstehen und mögliche Ansatzpunkte für etwaige Therapiemöglichkeiten identifizieren zu können. Die überwiegende Anzahl der entwickelten Mausmodelle schafft es zwar wesentliche neuropathologische Kennzeichen wie etwa Amyloidplaqueformationen, inflammatorische Prozesse oder Verhaltensauffälligkeiten nachzubilden (Wirhns und Bayer 2010), jedoch stellt dies zumeist nur einen Kompromiss dar, welcher die komplexe AD-Pathologie nicht in ihrer Gesamtheit abbilden kann (Elder et al. 2010). Zumeist beruhen die generierten neuropathologischen Veränderungen in Mausmodellen auf der Überexpression von Mutationen in APP und/oder PS-1/2 und replizieren damit die Form der fAD (Duyckaerts et al. 2008; Elder et al. 2010), welche jedoch nur einen sehr geringen Anteil der auftretenden Erkrankungsfälle ausmacht (siehe Absatz 1.8.1). Ein weiterer Kritikpunkt an vielen transgenen Mausmodellen bildet häufig auch die Abwesenheit eines signifikanten Nervenzellverlustes, welcher jedoch eng mit der Pathogenese der AD verknüpft ist (Wirhns und Bayer 2010).

Diese vorgenannten Grundlagen berücksichtigend, wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe die transgene Mauslinie Tg4-42 entwickelt, welche durch das vollständige Fehlen von Mutationen in APP- oder PS-Genen die sAD besser modellhaft reproduzieren soll (Y Bouter et al. 2013). Dieses Mausmodell exprimiert ausschließlich die N-trunkierte A $\beta$ -Variante A $\beta_{4-42}$  (TA Bayer 2021), welche nach Portelius et al. (2010) eine der dominierenden Fraktionen im Gehirn von AD-Patienten darstellt. Andere charakteristische AD-Pathologien wie etwa extrazelluläre Amyloidplaques oder die Formation von NFT aus dem Tau-Protein fehlen hingegen (Y Bouter et al. 2014).

Bei der Entwicklung der Tg4-42-Linie wurde eine humane A $\beta_{4-42}$ -Sequenz mit dem murinen *Thyrotropin-Releasing hormone* (TRH)-Signalpeptid fusioniert und unter die Kontrolle durch den neuronalen Thy-1-Promotor gestellt, der spezifisch im Gehirn exprimiert wird. Durch das

Prä-Pro-TRH- $A\beta_{442}$ -Fusionspeptid kann das  $A\beta_{442}$  nach weiteren Prozessierungsschritten im endoplasmatischen Retikulum sowie trans-Golgi-Netzwerk nach extrazellulär freigegeben werden (Y Bouter et al. 2013). Da die Tg4-42-Mauslinie kein humanes APP exprimiert, können die Eigenschaften des  $A\beta_{442}$ -Peptids ohne den störenden Einfluss von APP oder dessen Spaltprodukten anhand dieses Mausmodells gezielt untersucht werden.

Y Bouter et al. (2013) konnten in hemizygoten dreimonatigen Tg4-42-Mäusen eine ausgeprägte intraneuronale  $A\beta_{42}$ -Expression vor allem in der CA1-Region des Hippocampus nachweisen, die mit zunehmendem Alter der Tiere stark abnahm. Als weitere Regionen mit  $A\beta_{42}$ -Expression konnten unter anderem der okzipitale Kortex, der piriforme Kortex, das Striatum sowie die Colliculi superiores identifiziert werden (Y Bouter et al. 2013). Auf diese  $A\beta_{42}$ -Ablagerungen konnte als Reaktion eine ausgeprägte Mikro- sowie Astrogliose im Hippocampusbereich quantifiziert werden, welche bereits in einem Alter von zwei Monaten bei hemizygoten Tieren einsetzte. Darüber hinaus zeigten hemizygoter achtmonatige Tg4-42-Tiere in der CA1-Region des Hippocampus einen signifikanten Nervenzellverlust von rund 38% im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren, demgegenüber eine Kohorte aus homozygoten Mäusen bereits eine Abnahme der Neuronenzahl um 66% aufwies (Y Bouter et al. 2013). Dieser ausgeprägte Verlust an Nervenzellen konnte auch in den von Y Bouter et al. (2013) durchgeführten Verhaltensexperimenten nachvollzogen werden. So zeigte sich bereits bei achtmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen im Vergleich zur gleichaltrigen WT-Kontrollgruppe eine signifikante Einschränkung des räumlichen Gedächtnisses, wohingegen hemizygoter Tiere signifikante Gedächtnisstörungen erst in einem Alter von zwölf Monaten aufwies (Y Bouter et al. 2013). Weiterführende stereologische Quantifizierungen durch Antonios et al. (2015) deuteten darauf hin, dass signifikante Nervenzellverluste in der CA1-Region im Altersverlauf homozygoter Tg4-42-Mäuse bereits in einem Alter von rund fünf Monaten einsetzen. In der vorgenannten Arbeit zeigten zudem die fünfmonatigen homozygoten Tg4-42-Tiere im Vergleich zu dreimonatigen WT-Mäusen einen signifikanten Verlust von rund 43% ihrer Nervenzellen (Antonios et al. 2015). Ebenfalls zeigten die betrachteten homozygoten Tg4-42-Mäuse mit fünf Monaten erste Anzeichen eines beeinträchtigten räumlichen Gedächtnisses, welche sich bei sechs- und siebenmonatigen Tieren als deutlich ausgeprägt herausstellten (Antonios et al. 2015).

Insgesamt lassen sich die im Altersverlauf der Tg4-42-Mäuse entwickelten schweren Neuronenverluste im Bereich des Hippocampus sowie die daraus resultierenden Gedächtnisdefizite gut mit der intraneuronalen Expression des  $A\beta_{42}$  in diesem Bereich korrelieren (Y Bouter et al. 2014).

## 1.10 Die Antikörpertherapie als Behandlungsansatz

Einen Großteil der aktuellen therapeutischen Bemühungen kommt der Entwicklung vielversprechender Antikörpertherapien zu. Grundsätzlich wird hierbei eine aktive von einer passiven Form der Immunisierung unterschieden. Nachfolgend soll auf einige der gegenwärtigen Entwicklungen in kurzer Form eingegangen werden.

### 1.10.1 Konzept der aktiven Immunisierung

Bei der aktiven Immunisierung wird das körpereigene Immunsystem durch exogene Antigene zur Bildung von spezifischen Antikörpern angeregt (Brody und Holtzman 2008). So beimpften Schenk et al. (1999) erstmals transgene PDAPP-Mäuse, welche das humane APP überexprimierten, mit  $A\beta_{42}$  und konnten hierdurch bei jüngeren immunisierten Tieren die Plaquebildung, Neuritendystrophie sowie Astrogliose fast gänzlich verhindern. Bei älteren mit  $A\beta_{42}$  immunisierten Mäusen konnten die genannten Pathologien ebenfalls deutlich reduziert und in ihrer Progression eingeschränkt werden (Schenk et al. 1999). Aufgrund dieser aussichtsreichen Ergebnisse wurde das Prinzip der aktiven Immunisierung mit  $A\beta_{42}$  auf die klinische Forschung am Menschen übertragen und der Impfstoff AN1792 entwickelt, der auf synthetisch erzeugtem  $A\beta_{42}$  basierte und nachfolgend im Rahmen einer Phase-I-Studie getestet wurde (AJ Bayer et al. 2005). Bei einem verstorbenen Probanden dieser Studie wurde in der Autopsie eine Meningoenzephalitis nachgewiesen, welche als eine Nebenwirkung der durchgeführten Immunisierung betrachtet wurde (Nicoll et al. 2003). Darüber hinaus konnte auch bei einigen aktiv immunisierten Patienten der Phase-II-Studie im Verlauf die Entwicklung einer Enzephalitis beobachtet werden, sodass die Studie frühzeitig abgebrochen werden musste (Orgogozo et al. 2003). Aufgrund dieser prägenden Erfahrungen sowie den daraus resultierenden Sicherheitsbedenken konzentrierten sich die weiteren Forschungsbestrebungen vor allem auf die Entwicklung passiver Immunisierungsansätze.

### 1.10.2 Konzept der passiven Immunisierung

Unter einer passiven Immunisierung wird hingegen das direkte Einbringen von exogenen Antikörpern in einen Organismus verstanden, die das Immunsystem bei der Erregerabwehr unterstützen (Brody und Holtzman 2008). Bereits kurz nach Erscheinen der initialen Studie zur aktiven Immunisierung (siehe Absatz 1.10.1) konnte in zwei voneinander unabhängigen Publikationen gezeigt werden, dass auch durch eine passive Immunisierung mit monoklonalen gegen  $A\beta$  gerichteten Antikörpern eine ähnliche Reduktion der Plaquepathologie bei transgenen Mäusen erreicht werden konnte (Bard et al. 2000; DeMattos et al. 2001). Dieser Ansatz wurde in der weiteren Forschung aufgegriffen und zahlreiche Antikörper gegen unterschiedliche Epitope des  $A\beta$  entwickelt, die sich zum aktuellen Zeitpunkt in verschiedenen Phasen der präklinischen bzw. klinischen Erprobung befinden. Auf eine Auswahl dieser Antikörper soll im Folgenden näher eingegangen werden.



### 1.10.2.1 Solanezumab

Solanezumab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper vom Typ Immunglobulin-G1 (IgG), welcher direkt gegen die zentrale Region des A $\beta$ -Peptids (13-28) gerichtet ist und von Eli Lilly & Co. entwickelt wurde (Y Bouter et al. 2015; Panza et al. 2019). Der Antikörper bindet vorwiegend an die löslichen A $\beta$ -Monomere anstatt an fibrilläres A $\beta$  (Watt et al. 2014). Nach vielversprechenden Ergebnissen aus den Phase-II-Studien (Farlow et al. 2012; Siemers et al. 2010) folgten zwei großangelegte Phase-III-Studien mit insgesamt über 2000 Probanden mit milder bis moderater AD, welche jedoch keine signifikanten Verbesserungen in Bezug auf die Kognition oder funktionelle Fähigkeiten der mit Solanezumab behandelten Kohorte im Vergleich zur Placebogruppe erbringen konnten (Doody et al. 2014). Auch in einer sich anschließenden Studie, in welcher das Patientenkollektiv aus Patienten mit einer milden AD-Verlaufsform bestand, konnte die Therapie mit Solanezumab die kognitiven Einschränkungen nicht signifikant beeinflussen (Honig et al. 2018). Aktuell werden unter anderem im Rahmen einer weiteren Studie die Auswirkungen der Immunisierung mit Solanezumab auf kognitiv unauffällige Menschen mit nachgewiesener A $\beta$ -Akkumulation untersucht (Plotkin und Cashman 2020).

### 1.10.2.2 Crenezumab

Bei Crenezumab handelt es sich um einen humanisierten, monoklonalen IgG4-Antikörper, dessen Zielepitop ebenfalls im zentralen Bereich des A $\beta$  (12-23) liegt und von Genentech, einem Unternehmen der Hoffmann-La Roche AG, entwickelt wurde (Y Bouter et al. 2015; Rygiel 2016). Im Gegensatz zu Solanezumab hat dieser Antikörper eine hohe Affinität für höhermolekulare Formen des A $\beta$  wie Fibrillen, Oligomere oder auch Plaques und eine entsprechend geringere Affinität für Monomere (Plotkin und Cashman 2020). In diversen Phase-II-Studien konnte Crenezumab keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Placebogruppe in neuropsychologischen Tests erbringen und auch keine kognitiven sowie klinischen Verbesserungen hervorrufen (Panza et al. 2019). Die anschließenden Phase-III-Studien wurden im Januar 2019 durch La Roche abgebrochen, da sie voraussichtlich nicht ihre primären Endpunkte erreicht hätten (Plotkin und Cashman 2020). Gegenwärtig werden noch potenzielle Effekte einer Behandlung auf asymptotische PS1-Mutationsträger untersucht (Tariot et al. 2018).

### 1.10.2.3 Bapineuzumab

Bapineuzumab ist ein humanisierter, monoklonaler IgG1-Antikörper, der gegen den N-Terminus des A $\beta$  gerichtet ist und die A $\beta_{1-5}$ -Region erkennt (Rygiel 2016). Er wurde durch die Pharmakonzerne Pfizer und Johnson & Johnson entwickelt. Im Gegensatz zu den anderen hier erwähnten Antikörpern werden durch Bapineuzumab keine N-trunkierten bzw. modifizierten A $\beta$ -Formen gebunden (Y Bouter et al. 2015). Bapineuzumab war der erste monoklonale Antikörper, der nach Einstellung der Studien zu AN1792 am Menschen getestet wurde (Plotkin und Cashman 2020). Allerdings zeigten die folgenden Studien keine signifikanten

Ergebnisse in Bezug auf die kognitive Funktion und ergaben sogar Hinweise auf ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung eines vasogenen Hirnödems bei der behandelten Patientengruppe (Salloway et al. 2009). Auch spätere Phase-III-Studien ergaben keine vielversprechenden Vorteile der Therapie, sodass die Weiterentwicklung daraufhin eingestellt wurde (Salloway et al. 2014).

#### 1.10.2.4 Gantenerumab

Gantenerumab (Hoffmann-La Roche/Genentech) ist ein vollständiger humaner, monoklonaler IgG1-Antikörper, der vorzugsweise an fibrilläres A $\beta$ , jedoch nicht an die löslichen A $\beta$ -Formen bindet und eine Phagozytose durch hirneigene Mikrogliazellen auslösen soll (Rygiel 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Gantenerumab an zwei nicht zusammenhängende Regionen des A $\beta$ -Peptids mit der höchsten Affinität zu A $\beta_{2-11}$  sowie A $\beta_{18-27}$  binden kann (Bohrmann et al. 2012; Plotkin und Cashman 2020). Zwei große Phase-III-Studien scheiterten an einer vorläufigen *Futility*-Analyse und wurden zu *Open-label*-Studien umgestaltet (Ostrowitzki et al. 2017; Panza et al. 2019). Neueren Ergebnissen einer daraus entstandenen Substudie zufolge, deren Patienten sich in einem prodromalen bis moderaten AD-Stadium befanden, konnte Gantenerumab die mittels Amyloid-PET objektivierte A $\beta$ -Plaquelastung dieser Probanden nachweislich verringern (Klein et al. 2019).

#### 1.10.2.5 Aducanumab

Bei Aducanumab (Neurimmune/Biogen) handelt es sich ebenfalls um einen vollständigen humanen, monoklonalen IgG1-Antikörper, der lösliche A $\beta$ -Aggregate und unlösliche Fibrillen bindet und nur schwach mit A $\beta$ -Monomeren interagiert (Plotkin und Cashman 2020). Der Antikörper soll ein lineares Epitop des A $\beta$ -Peptids binden, welches durch die Aminosäuren 3-7 geformt wird (Arndt et al. 2018). In einer durchgeführten Phase-Ib-Studie konnte durch die Applikation von Aducanumab die mittels PET-Diagnostik ermittelte A $\beta$ -Belastung der Studienteilnehmer reduziert und signifikante Verbesserungen der kognitiven Leistungsfähigkeit erzielt werden (Sevigny et al. 2016). Zwei daraufhin gestartete Phase-III-Studien (ENGAGE und EMERGE) wurden allerdings bereits im März 2019 vorerst durch Biogen abgebrochen, da bei einer Zwischenanalyse deutlich wurde, dass beide Studien ihre primären Endpunkte zur Verlangsamung des kognitiven Abbaus vermutlich nicht erreichen würden (Plotkin und Cashman 2020). Nachträglich zeigte jedoch die Auswertung eines größeren Datensatzes, dass die initiale *Futility*-Analyse fehlerhaft gewesen sein musste und EMERGE entgegen der vorherigen Annahme doch den primären Endpunkt erreicht hätte (Plotkin und Cashman 2020). Schließlich reichte Biogen Anfang Juli 2020 einen Zulassungsantrag für Aducanumab bei der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) ein (Fagan 2020), welcher jedoch im November 2020 fast einstimmig abgelehnt wurde (Esang und Gupta 2021). Trotz weiterhin anhaltender Diskussionen genehmigte die FDA im Juni 2021 im Rahmen eines beschleunigten Zulassungsverfahrens die vorzeitige therapeutische Anwendung des Antikörpers, dessen klinische Wirksamkeit jedoch innerhalb von neun Jahren

in einer entsprechenden Phase-IV-Studie nachgewiesen werden muss (Esang und Gupta 2021; Musiek et al. 2021).

#### 1.10.2.6 NT4X

Der NT4X-Antikörper ist ein muriner, monoklonaler IgG2b-Antikörper, welcher in unserem Labor entwickelt wurde und sich aktuell in der präklinischen Testung befindet (TA Bayer 2021; Y Bouter et al. 2015). Die Entwicklungsschritte des Antikörpers wurden bereits umfassend durch Antonios et al. (2013) beschrieben. Der NT4X-Antikörper bindet die oligomeren, N-trunkierten Formen  $A\beta_{4-42}$  sowie  $A\beta_{pE3-42}$ , jedoch nicht das Volllängenpeptid  $A\beta_{1-42}$  (Y Bouter et al. 2015). Diese Bindungsfähigkeit basiert im Wesentlichen auf einem Phenylalaninrest an vierter Position der Aminosäuresequenz der  $A\beta$ -Peptide, wie durch *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*-Verfahren demonstriert werden konnte (Antonios et al. 2013). In humanem Gewebe zeigt NT4X eine äußerst geringe Bindungsaffinität zu Amyloidplaques, detektiert jedoch vorhandene Amyloidangiopathien (Y Bouter et al. 2015). Eine relevante Kreuzreaktivität zu zerebralen Proteinablagerungen anderer neurodegenerativer Erkrankungen weist NT4X nicht auf (Antonios et al. 2013). Anhand von *in vitro* durchgeführten Toxizitätsbestimmungen konnten die potenziell protektiven Eigenschaften des NT4X-Antikörpers durch eine spezifische Reduktion der von  $A\beta_{4-42}$  sowie  $A\beta_{pE3-42}$  ausgehenden Toxizität belegt werden (Antonios et al. 2015; TA Bayer 2021). *In vivo* konnten bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen durch eine Immunisierung mit NT4X wesentliche Einschränkungen im räumlichen Gedächtnis verhindert und eine signifikante Verminderung des Nervenzellverlustes in der CA1-Region des Hippocampus erreicht werden (Antonios et al. 2015).

### 1.11 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Der modifizierten Amyloidhypothese zufolge bilden intraneuronale  $A\beta$ -Ablagerungen ein besonders frühes Ereignis in der Pathogenese der AD (siehe Absatz 1.7.4). Insbesondere  $A\beta_{pE3-42}$  sowie  $A\beta_{4-42}$  konnten neben den  $A\beta$ -Volllängenpeptiden als dominierende Fraktionen in den Gehirnen von AD-Patienten nachgewiesen werden (Portelius et al. 2010). In umfassenden Studien zeigten Y Bouter et al. (2013) anhand des Tg4-42-Mausmodells, welches selektiv die  $A\beta_{4-42}$ -Variante exprimiert, deutliche Nervenzellverluste in der CA1-Region des Hippocampus mit daraus resultierenden Einschränkungen des Lernverhaltens sowie des räumlichen Gedächtnisses der Tiere, welche primär auf die ausgeprägte  $A\beta_{4-42}$ -Belastung zurückgeführt werden konnten. *In vitro* konnte der toxische Effekt dieses  $A\beta_{4-42}$ -Peptids durch den monoklonalen Antikörper NT4X vermindert werden (Antonios et al. 2013). Auch *in vivo*-Experimente an homozygoten Tg4-42-Mäusen zeigten deutliche Behandlungseffekte einer Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper hinsichtlich des Arbeits- sowie räumlichen Gedächtnisses der Tiere. Ferner konnten die zuvor beschriebenen Neuronenverluste in der CA1-Region bei diesen Tieren durch die Behandlung signifikant gemildert werden (Antonios et al. 2015).

Die nachfolgende Arbeit widmet sich insbesondere der weiteren Evaluation des therapeutischen Potenzials des NT4X-Antikörpers sowie des Tg4-42-Mausmodells. Zunächst soll das Areal des Hippocampus von homozygoten Tg4-42-Tieren detailliert auf eine Expression von  $A\beta_{42}$  untersucht werden. Anschließend werden junge, dreimonatige homozygote Tg4-42-Mäuse hinsichtlich der Auswirkungen des Transgens in Bezug auf die Nervenzellzahl sowie das Volumen des GD im Vergleich zu gleichalten WT-Tieren analysiert. Das therapeutische Potenzial des NT4X-Antikörpers soll folglich anhand von sechs Monate alten homozygoten Tg4-42-Mäusen im Vergleich zu gleichalten Kontrollkohorten evaluiert werden. Hierzu werden als Parameter ebenfalls die Neuronenzahl sowie das Volumen im Bereich des GD und der CA2/3-Region des Hippocampus betrachtet. Außerdem erfolgt eine vergleichende Analyse der Neurogeneserate der NT4X-immunisierten Tiere mit unbehandelten Tg4-42-Mäusen. Abschließend sollen noch die transgenen Tiere bezüglich neuroinflammatorischer Prozesse (Mikrogliose und Astrogliose) im Hippocampusbereich untersucht und ein möglicher Einfluss der Immunisierung mit NT4X beurteilt werden.

Zusammenfassend soll diese Arbeit detailliert auf folgende Fragestellungen eingehen:

1. Zeigen neben der CA1-Region weitere Areale des Hippocampus eine Expression von  $A\beta_{42}$  in homozygoten Tg4-42-Mäusen?
2. Kommt es bereits bei jungen, dreimonatigen homozygoten Tg4-42-Tieren zu Veränderungen der Neuronenzahl oder des Volumens im Bereich des GD?
3. Wie wirkt sich die Immunisierung mit NT4X auf die Nervenzellzahl und das Volumen im Bereich des GD sowie der CA2/3-Region bei homozygoten Tg4-42-Mäusen aus?
4. Wie beeinflusst die Gabe von NT4X die Neurogeneserate in der SGZ des GD bei diesen Tieren?
5. Welchen Einfluss hat der NT4X-Antikörper auf neuroinflammatorische Prozesse im Hippocampusbereich bei homozygoten Tg4-42-Mäusen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

In der nachfolgenden Tabelle 1 werden alle Chemikalien, Reagenzien und Kits, welche für die beschriebenen Experimente verwendet wurden, in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

**Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Kits**

Chemikalie/Reagenz/Kit	Hersteller, Stadt, Land
100 bp Desoxyribonukleinsäure (DNA) Ladder	Bioron GmbH, Ludwigshafen, D
10x Reaktionspuffer	Axon, Kaiserslautern, D
30% D(+)Saccharose-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Agarose SeaKem® LE	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Ameisensäure (Methansäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Avidin-Biotin-Complex (ABC) – Vectastain Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Borsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Citronensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Diaminobenzidin (DAB)-Peroxidase-Substrate-Kit SK-4100	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol 99% vergällt	ChemSolute GmbH & Co. KG, Renningen, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D

Chemikalie/Reagenz/Kit	Hersteller, Stadt, Land
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, D
Hämatoxylin-Lösung	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
HD Green Plus DNA Stain	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Kresylviolett	Fluka Chemic, München, D
Lysepuffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, D
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumacetat-Trihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Paraffin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, D
Primer Aß3-42 for2 5'3' - TCCGGCCAGAACGTCGATTC	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
Primer Aß3-42 rev2 5'3' - GGAGAAGCAAGACCTCTGC	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
Proteinase K	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Reinstwasser (dH <sub>2</sub> O)	AG Bayer, Göttingen, D
Roti® Histofix (4%ige phosphatgepufferte Formaldehydlösung, PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Roti®-Histokit (Einbettmedium)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Chemikalie/Reagenz/Kit	Hersteller, Stadt, Land
Roti®-Mount FluorCare DAPI (Fluoreszenz-Einbettmedium)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Taq-Polymerase	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt, D
Triton™ X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol)	Merck, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

### 2.1.2 Technische Apparaturen

In Tabelle 2 werden alle verwendeten technischen Apparaturen alphabetisch und mit ihren jeweiligen Herstellerinformationen aufgelistet.

**Tabelle 2: Geräteliste**

Gerät	Hersteller, Stadt, Land
BlueCube 300	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Heracus Biofuge Stratos Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heracus Wärmeschrank	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
HistoCore Arcadia C (Kühlplatte)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
LEICA CM1850 UV (Kryostat)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
LEICA EG 1140H (Paraffin-Einbett-Station)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
MEDAX Wärmebad	Nagel GmbH, Kiel, D
Microm HM335 (Mikrotom)	Microm, Walldorf, D
Mikrowelle NN-E201 WM	Panasonic, Kadoma, JPN

Gerät	Hersteller, Stadt, Land
MoticamPro 282B Digitalkamera	Motic Asia, Kowloon, Hong Kong, CHN
NanoDrop™ One C Photospektrometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Nikon DS-Qi2 Kamera	Nikon Corporation, Tokio, JPN
Nikon ECLIPSE Ti Mikroskop	Nikon Corporation, Tokio, JPN
Olympus BX51 Mikroskop	Olympus, Shinjuku, JPN
Thermocycler	SensoQuest, Hamburg, D
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, D
UNO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, D

### 2.1.3 Weitere Utensilien

In Tabelle 3 werden weitere Utensilien und Produkte alphabetisch aufgelistet, die im Rahmen der durchgeführten Experimente eine Verwendung fanden.

**Tabelle 3: Weitere Utensilien und Produkte**

Produkt	Hersteller, Stadt, Land
Corning Costar Netwell Plates (12-Lochplatte)	Corning, New York, USA
Deckgläschen (24 x 60 mm)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Elektrophoresekammer BlueMarine™ 100 + 8 Kammer-Gelkamm 1 mm	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Eppendorfggefäß	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
IVC-Käfig	Tecniplast, Hohenpeißenberg, D
Microtome Blades C35	Feather, Osaka, JPN
Pap Pen (Lipidstift)	Kisker Biotech, Steinfurt, D



Produkt	Hersteller, Stadt, Land
PCR-Gefäße	Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, A
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Rotilabo® Einbettkassetten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Superfrost® Objektträger	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Tissue-Tek® O.C.T Compound Gewebekleber	Sakura Finetek GmbH, Staufen, D
Transferringpipetten (3,5 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

### 2.1.4 Antikörper

In Tabelle 4 (Primäre Antikörper) sowie Tabelle 5 (Sekundäre Antikörper) werden die verwendeten Antikörper in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Diesen werden in den nachfolgenden Tabellen ihre jeweilige Verwendung sowie die eingesetzte Konzentration zugeordnet.

**Tabelle 4: Primäre Antikörper**

Antikörper	Host	Epitop	Hersteller	Verwendung/Konzentration
Abeta42	Hase	A $\beta$ <sub>37-42</sub>	Synaptic Systems, Göttingen, D	IH (1:500)
Doublecortin (DCX)	Hase	Doublecortin	Synaptic Systems, Göttingen, D	FF (1:4000)
GFAP	Hase	GFAP (Astroglia)	Synaptic Systems, Göttingen, D	IH (1:1000), fl. IH (1:1000)
IBA-1	Meerschwein	IBA-1 (Mikroglia)	Synaptic Systems, Göttingen, D	IH (1:1000), fl. IH (1:500)
NT4X	Maus	A $\beta$ <sub>p1-42</sub> , A $\beta$ <sub>pE3-X</sub> , A $\beta$ <sub>4-X</sub>	AG Bayer, Göttingen, D*1	I (1:100)
Solanezumab <sub>BS</sub> (biosimilar)	humanisiert	Mittlere A $\beta$ -Domäne	Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA	fl. IH (1:2500)

\*1: (Antonios et al. 2013)

**Verwendung:** (I) Immunisierung, (IH) Immunhistochemie, (FF) Free-floating Verfahren, (fl. IH) Fluoreszenz-Immunhistochemie

**Tabelle 5: Sekundäre Antikörper**

Antikörper	Host	Verbindung	Hersteller	Verwendung/Konzentration
Anti-Hase	Schwein	biotinyliert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Sulfolk, UK	FF (1:250), IH (1:200)
Anti-Hase (488 nm)	Esel	fluoreszierend	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	fl. IH (1:200)
Anti-Human (594 nm)	Esel	fluoreszierend	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	fl. IH (1:200)
Anti-Meerschwein	Esel	biotinyliert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Sulfolk, UK	IH (1:200)
Anti-Meerschwein (650 nm)	Ziege	fluoreszierend	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	fl. IH (1:200)

**Verwendung:** (IH) Immunhistochemie, (FF) Free-floating Verfahren, (fl. IH) Fluoreszenz-Immunhistochemie

## 2.1.5 Tiere

### 2.1.5.1 Allgemeines und Haltungsbedingungen

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Versuchstiere entstammten der Spezies der Hausmaus (*Mus musculus*). Als Vergleichskohorte dienten WT-Tiere aus der Mauslinie C57Bl/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Die Tiere wurden nach den Vorgaben der „Gesellschaft für Versuchstierkunde“ (GV-SOLAS) sowie der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA) behandelt. Sämtliche experimentelle Studien an den Versuchstieren wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bewilligt und von speziell ausgebildeten Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) in einzeln belüfteten IVC-Käfigen gehalten. Diese Käfige wiesen die Abmessungen 32 cm Länge x 15 cm Breite x 14,5 cm Höhe auf. Sowohl Futter als auch Wasser standen den Tieren zu jeder Zeit in ausreichender Menge zur freien Verfügung.

### 2.1.5.2 Immunisierungsprotokoll

Um das therapeutische Potential des monoklonalen Antikörpers NT4X zu evaluieren, wurden homozygote Tg4-42-Mäuse mit diesem Antikörper passiv immunisiert (Antonios et al. 2015). Ab einem Lebensalter von drei Monaten erhielten die homozygoten Tg4-42-Mäuse

über einen Zeitraum von zwölf Wochen je eine wöchentliche intraperitoneale Injektion des NT4X-Antikörpers (Antonios et al. 2015). Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert mit 10 mg/kg Körpergewicht NT4X verdünnt in einer sterilen PBS-Lösung mit einem pH von 7,4 (Antonios et al. 2015). Als eine der Kontrollgruppen dienten homozygote Tg4-42-Tiere, welche anstatt des NT4X-Antikörpers im gleichen Zeitintervall gewichtsadaptierte, intraperitoneale Injektionen ausschließlich mit steriler PBS-Lösung erhielten (nachfolgend als „PBS-Tiere“ bezeichnet). Eine weitere Kontrollkohorte bildeten unbehandelte, gleichaltrige WT-Mäuse aus der C57Bl/6J-Mauslinie.

### 2.1.6 Aufbereitung des Hirngewebes

Die Versuchstiere wurden nach der letzten intraperitonealen Injektion beziehungsweise nach sechs Lebensmonaten mittels CO<sub>2</sub>-Anästhesie betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Präparation des Schädels sowie die Teilung des Gehirns in beide Großhirnhemisphären. Die linke Hemisphäre wurde nach der Fixierung in PFA für bis zu drei Tage in 30%iger Saccharoselösung bei rund 4°C gelagert. Anschließend wurde das Präparat eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die rechte Großhirnhemisphäre wurde hingegen direkt in speziellen Einbettkassetten verpackt und für mindestens 72 Stunden in einer 4%igen PFA-Lösung gelagert, ehe das Gewebe nachfolgend in Paraffin fixiert werden konnte. Sämtliche Handlungen erfolgten ausschließlich durch speziell geschultes und autorisiertes Personal unserer Arbeitsgruppe.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Genotypisierung von Tg4-42-Mäusen

Um das Transgen in Tg4-42-Mäusen nachzuweisen wurde exemplarisch aus Mausschwanzbiopsien die DNA isoliert und die entsprechenden Genabschnitte durch eine Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) amplifiziert und gelelektrophoretisch differenziert.

#### 2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Schwanzbiopsien

Eine Mausschwanzbiopsie wurde in ein Eppendorfgefäß mit 200 µl Lysepuffer [100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA, 0,2% Natriumdodecylsulfat (SDS), 100 mM NaCl] und Proteinase K [10 µl/ml in wässriger Lösung] gegeben. Darauf wurde das Gewebe für ca. 20 Stunden bei 56°C im Thermomixer (~450 U/min) lysiert. Anschließend wurde die Probe für 20 Minuten bei 17.000 U/min und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß mit 200 µl kaltem Isopropanol gegeben. Die Probe wurde geschwenkt, bis ein DNA-Präzipitat sichtbar war und erneut für 10 Minuten bei 13.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand abgegossen und das Pellet mit 200 µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals bei 13.000 U/min zentrifugiert.

Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und eventuelle Ethanolreste vorsichtig abpipettiert. Daraufhin wurde das Pellet bei 56°C für etwa eine Stunde auf dem Thermoblock getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 30 µl Reinstwasser gelöst und über Nacht bei 56°C im Thermomixer inkubiert.

#### 2.2.1.2 Quantifizierung der DNA Konzentration

Die Konzentration der zuvor isolierten DNA wurde mittels Nano Drop One C Photometer gemessen. Hierzu wurden jeweils 2 µl der Proben nacheinander auf den Messarm pipettiert und quantifiziert. Als Leerwert diente hierbei der gemessene Wert für das verwendete Reinstwasser, in dem die DNA zuvor gelöst wurde. Die Konzentrationen der Nukleinsäuren [ng/µl] sowie deren Reinheit (260/280) wurde notiert und die jeweiligen Proben auf eine einheitliche Konzentration von 20 ng/µl verdünnt.

#### 2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Von den verdünnten DNA-Proben (20 ng/µl) wurden jeweils 2 µl mit 18 µl eines PCR-Mastermixes (siehe Tabelle 6) in spezielle PCR-Gefäße (0,2 ml) gegeben und anschließend nach dem in Tabelle 7 dargestellten Protokoll in einem Thermocycler amplifiziert.

**Tabelle 6: Mastermix für eine Tg4-42-PCR**

Reagenz	Volumen [µl]
Aβ3-42 for2 Primer	1,0
Aβ3-42 rev2 Primer	1,0
dNTPs	2,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6
10x Reaktionspuffer	2,0
H <sub>2</sub> O	10,2
Taq Polymerase	0,2

**Tabelle 7: Protokoll der Temperaturzyklen im Thermocycler**

Schritt	Dauer [s]	Temperatur [°C]
1.	180	94
2.	45	94
3.	60	58
4.	60	72
5.	Wiederholen von Schritt 2.-4. (35 Mal)	
6.	300	72
7.	∞	4

#### 2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels wurden 50 ml 5x TBE-Puffer pH 8,3 [54,5 g/l Tris, 27,8 g/l Borsäure, 20 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA pH 8,0] mit 200 ml Wasser gemischt. Hiervon wurden 35 ml mit 0,7 g Agarose in der Mikrowelle bei ~300 W aufgekocht und der Rest in eine Elektrophoresekammer gefüllt. Anschließend wurde das Gemisch auf 65°C abkühlen gelassen, mit 2 µl HD Green Plus DNA Stain versetzt und in eine Gießschale gegossen, die mit einem Kammer-Gelkamm bestückt wurde. Das abgekühlte Agarose-Gel wurde daraufhin vorsichtig in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Dann wurden die Taschen des Gels jeweils mit 10 µl der DNA-Proben aus der PCR, gemischt mit 2 µl Ladepuffer, befüllt. Als Referenz diente ein 100 bp DNA Ladder, der ebenfalls in eine der Taschen pipettiert wurde. Nachfolgend wurde für etwa 30 Minuten eine Spannung von 135 Volt angelegt. Abschließend wurde das Gel in dem BlueCube 300 unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm analysiert.

#### 2.2.2 Analyse der A $\beta$ <sub>42</sub>-Expression in Tg4-42-Mäusen

Zur Analyse des A $\beta$ <sub>42</sub>-Expressionsverhaltens in Tg4-42-Mäusen wurden Gewebeschnitte von drei Monate alten, homozygoten Tieren der Tg4-42-Mauslinie mikroskopisch untersucht. Dafür wurden mit dem A $\beta$ <sub>42</sub>-spezifischen Antikörper Abeta42 (siehe Tabelle 4) immunhistochemisch angefärbte Präparate verwendet. Diese gefärbten Gewebeschnitte wurden freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. Yvonne Bouter zur Verfügung gestellt und dürfen im Rahmen dieser Dissertation verwendet werden. Die Aufnahme der dargestellten Bilder erfolgte mithilfe eines Olympus BX51-Mikroskops, das mit einer MoticamPro 282B Digitalkamera ausgestattet war.

#### 2.2.3 Quantifizierung der Neuronenzahl und des Volumens

##### 2.2.3.1 Herstellung histologischer Schnitte am Kryostat

Mittels eines Kryostaten wurden jeweils die linken Großhirnhemisphären der Mäuse in 30 µm dicke Schnitte zerteilt. Hierzu wurden die Hemisphären in vertikaler Ausrichtung mit Gewebekleber auf dem Schneideblock des Kryostaten fixiert. Die gesamte Gehirnhälfte wurde in koronarer Ebene geschnitten und die Gewebeschnitte in fester Reihenfolge auf zehn beschriftete Gläschen verteilt. Folglich befand sich jeder zehnte Schnitt des Gehirns in demselben Gefäß. Schließlich wurden die Gewebeschnitte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

##### 2.2.3.2 Kresylviolett-Färbung

Mit der nachfolgend beschriebenen Kresylviolett-Färbung wurden in den nach Absatz 2.2.3.1 angefertigten Gewebeschnitten die Nervenzellen angefärbt, um diese später stereologisch quantifizieren zu können. Die gefrorenen Gehirnschnitte wurden dazu in kalter 0,01 M

PBS-Lösung rehydriert, vorsichtig auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

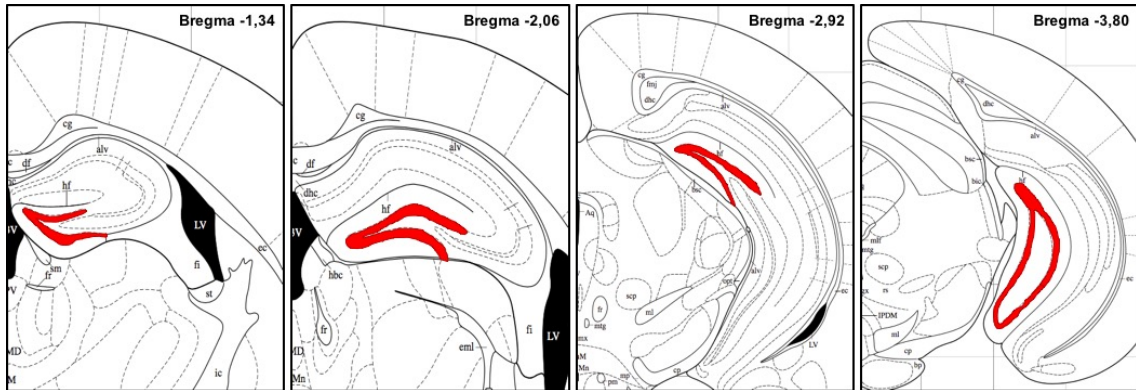
Am Vortag der eigentlichen Färbung wurden die benötigten Lösungen angesetzt. Zuerst wurden 13,61 g Natriumacetat-Trihydrat in 100 ml destilliertem Wasser gelöst und somit eine 1 M Natriumacetatlösung hergestellt (genannt Stammlösung 1A). Von dieser Stammlösung 1A wurden 40 ml mit 9,6 ml 100%iger Essigsäure vermischt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt, wodurch die Arbeitslösung 1B entstand. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 0,1 g Kresylviolett in 1000 ml der Arbeitslösung 1B gelöst und über Nacht auf einer Magnetrührplatte verrührt. Die Lösung wurde durch Aluminiumfolie vor direktem Lichteinfall geschützt und unmittelbar vor Gebrauch gefiltert. Für die Delipidierung wurde aus 0,2 ml Triton X-100 und 9,8 ml destilliertem Wasser unter einstündigem Rühren die Stammlösung 3A hergestellt. Aus 2,5 ml Stammlösung 3A, 50 ml destilliertem Wasser sowie 150 ml 100%igem Ethanol entstand wiederum die benötigte Arbeitslösung 3B.

Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebeschnitte zuerst durch folgenden Ablauf entfettet: zweimal 10 Minuten in Arbeitslösung 1B, darauf 20 Minuten in Arbeitslösung 3B und erneut zweimal 10 Minuten in Arbeitslösung 1B. Nach abgeschlossener Delipidierung erfolgte zweimal für je 8 Minuten die Färbung mittels gefilterter Kresylviolett-Lösung. Danach wurden die Schnitte dreimal für jeweils 1 Minute in Arbeitslösung 1B gewaschen und mit einer Alkoholreihe dehydriert: zuerst für 3 Minuten in 100%igem Ethanol, gefolgt von 10 Minuten in Isopropanol und zweimal für je 5 Minuten in Xylol. Abschließend wurden die Gewebeschnitte unter Verwendung eines synthetischen Einschlussmittels mit Deckgläschen eingebettet.

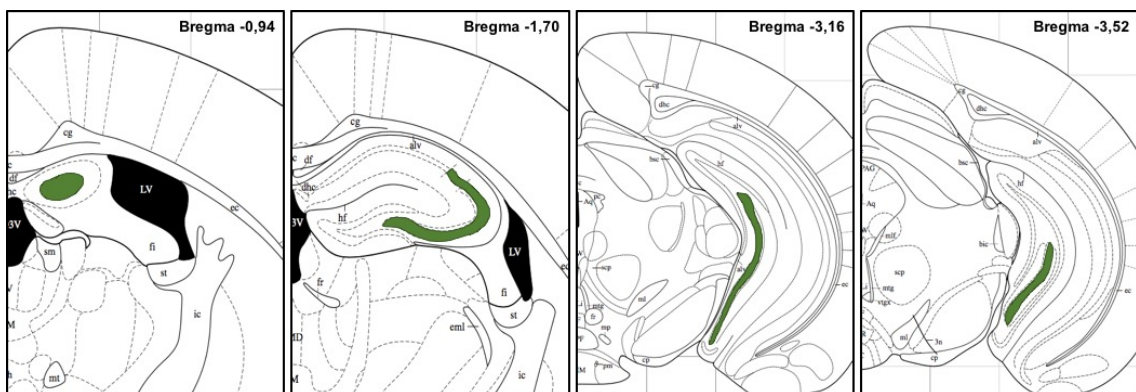
### 2.2.3.3 Design-basierte Stereologie

Zur Ermittlung der Nervenzellzahl wurde die design-basierte Stereologie angewendet. Verwendet wurde dafür ein Olympus BX51-Mikroskop mit einem motorisierten Objektisch sowie die Software Stereo Investigator 7. Die design-basierte Stereologie ermöglicht es auf Basis von zweidimensionalen Bildaufnahmen Aussagen über die dreidimensionale Struktur eines Gewebes zu treffen (West 2012) und damit diverse Parameter wie etwa Volumen oder Zellzahl zu errechnen. Dies kann unabhängig von Größe, Form, räumlicher Orientierung oder räumlicher Verteilung des Gewebes geschehen (West 2002). Mithilfe der *optical fractionator*-Methode kann ausgehend von einer systematischen Stichprobe repräsentativ und erwartungsgetreu (*unbiased*) auf die Gesamtzellzahl einer bestimmten Hirnregion geschlossen werden (Schmitz und Hof 2005; West et al. 1991). Diese Systematik spiegelt sich in der zufälligen Auswahl der nach Absatz 2.2.3.1 erstellten Gläschen mit Hirngewebe wieder, deren Schnitte einen festen Abstand von 300 µm zueinander aufwiesen, da nur jeder Zehnte der 30 µm dicken Gewebeschnitte für die folgende stereologische Auswertung herangezogen wurde.

Die stereologische Quantifizierung erfolgte anhand der nach Absatz 2.2.3.2 mit Kresylviolett angefärbten Hirnschnitte für die granuläre Zellschicht des GD sowie die CA2- und CA3-Region des Hippocampus. Zur Eingrenzung sowie Differenzierung der vorstehend genannten Hirnregionen wurde der Maushirnatlas von Franklin und Paxinos (2001) verwendet.



**Abbildung 3: Übersicht über den Bereich des GD.** Das Zählgebiet für den GD wurde auf einen Bereich zwischen Bregma -1,34 mm bis -3,80 mm eingegrenzt. Der GD ist auf der Abbildung rot hervorgehoben. Die Bildausschnitte entstammen dem Maushirnatlas von Franklin und Paxinos und wurden entsprechend modifiziert (Franklin und Paxinos 2001).



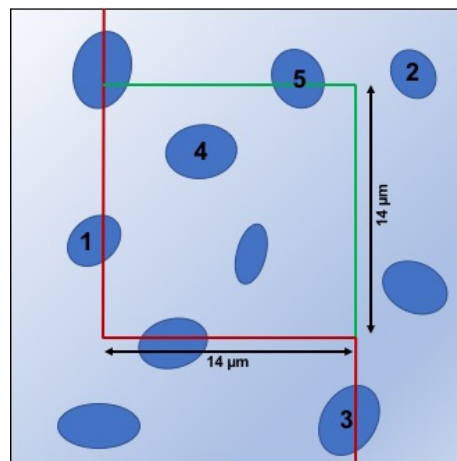
**Abbildung 4: Übersicht über die CA2- und CA3-Region des Hippocampus.** Die Auswertung der CA2- und CA3-Region erfolgte aufgrund der ungenauen Abgrenzbarkeit voneinander in kombinierter Form von Bregma -0,94 mm bis -3,52 mm, wobei die CA2-Region bis einschließlich etwa Bregma -2,70 mm berücksichtigt wurde. Das Zählgebiet ist in der Abbildung grün dargestellt. Die Bildausschnitte entstammen dem Maushirnatlas von Franklin und Paxinos und wurden entsprechend modifiziert (Franklin und Paxinos 2001).

Zunächst wurde die entsprechende Hirnregion in vierfacher Vergrößerung des Mikroskops manuell umrandet. Anschließend wurde die umrandete Region durch die Software mit einem Raster (*sampling grid*), welches nach zuvor festgelegten und für die jeweilige Hirnregion spezifischen Parametern (siehe Tabelle 8) erzeugt wurde, überzogen und zufällig Zählrahmen (*counting frames*) gleichmäßig auf die zu quantifizierende Fläche verteilt. Hierbei wurde die 100-fache Vergrößerung des Mikroskops verwendet. Für jeden der auszuwertenden Zählrahmen wurde folglich die Schnittdicke individuell gemessen und durch eine zuvor festgelegte *optical disector height* von 5  $\mu\text{m}$  zu einem dreidimensionalen Gebilde ergänzt. Als *top guard zone* wurden

2  $\mu\text{m}$  gewählt. Eine schematische Darstellung des Zählrahmens sowie eine kurze Erläuterung der angewandten stereologischen Zählregeln findet sich nachfolgend in Abbildung 5.

**Tabelle 8: Parameter der stereologischen Analysen**

Parameter	Gyrus dentatus	CA2/3-Region
Sampling Grid (X) ( $\mu\text{m}$ )	133	80
Sampling Grid (Y) ( $\mu\text{m}$ )	75	120
Sampling Grid Area (XY) ( $\mu\text{m}^2$ )	9975	9600
Counting Frame Width (X) ( $\mu\text{m}$ )	14	14
Counting Frame Height (Y) ( $\mu\text{m}$ )	14	14
Counting Frame Area (XY) ( $\mu\text{m}^2$ )	196	196
Disector Height (Z) ( $\mu\text{m}$ )	5	5
Disector Volume (XYZ) ( $\mu\text{m}^3$ )	980	980
Thickness of mounted tissue ( $\mu\text{m}$ )	30	30
Section Periodicity	10	10



**Abbildung 5: Schematische Veranschaulichung des Zählrahmens sowie kurze Erläuterung der Stereologie-Regeln.** Es wurden ausschließlich Nervenzellen mit scharfen Zellkernen gezählt, die sich innerhalb des vorgegebenen Zählrahmens befanden oder zumindest die grünen Begrenzungslinien berührten (4, 5). Nicht gezählt wurden Zellen, welche sich außerhalb des Zählrahmens (2) befanden oder in Kontakt zu den roten Begrenzungslinien standen (1, 3). Abbildung erstellt nach Schmitz und Hof (2005).

Die entsprechenden Nervenzellzahlen wurden anhand der nachfolgenden Formeln errechnet (Schmitz und Hof 2005). Die Gleichung 1) stellt die Gesamtgleichung dar. Die Gleichungen 2), 3) und 4) veranschaulichen die Berechnung der einzelnen Faktoren.



$$1) \quad P = asf \times ssf \times tsf$$

$$2) \quad asf = \frac{\text{sampling grid area (xy)}}{\text{sampling frame area (xy)}}$$

$$3) \quad ssf = 10 \text{ (nur jeder 10. Schnitt wird verwendet)}$$

$$4) \quad tsf = \frac{\text{number weighted mean section thickness}}{\text{disector height (z)}}$$

Die aus der Gesamtgleichung berechnete Zahl P wurde mit der ermittelten Neuronenzahl (*total markers counted*) multipliziert, sodass sich folglich die Nervenzellzahl des untersuchten Gewebeschnittes  $N_{\text{Schnitt X}}$  ergab.

$$5) \quad N_{\text{Schnitt X}} = P \times \text{total markers counted}$$

Abschließend wurden die Neuronenzahlen der jeweiligen Abschnitte ( $N_{\text{Schnitt X}}$ ) addiert, um die Gesamtnervenzellzahl ( $N_{\text{gesamt}}$ ) zu erhalten.

$$6) \quad N_{\text{gesamt}} = N_{\text{Schnitt 1}} + N_{\text{Schnitt 2}} + N_{\text{Schnitt 3}} + \dots$$

Zur Berechnung des Volumens der jeweiligen Hirnregion wurde die Formel „Cavalieri’s Estimator of Morphometric Volume  $V_C$ “ verwendet, die nachfolgend dargestellt ist (Rosen und Harry 1990).

$$V_C = d \left[ \sum_{i=1}^n (y_i) \right] - (t)y_{max}$$

$d$ : Abstand zwischen den analysierten Schnitten (300  $\mu\text{m}$ )

$y_i$ : Fläche von Schnitt $_i$  [ $\mu\text{m}^2$ ]

$t$ : jeweilige Schnittdicke [ $\mu\text{m}$ ]

$y_{max}$ : größte gemessene Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ]

Das Produkt  $(t)y_{max}$  wird zur Korrektur einer möglichen Überschätzung von der oben angeführten Formel subtrahiert.

## 2.2.4 Quantifizierung der Neurogenese

### 2.2.4.1 Free-floating-Immunhistochemie

Um die Neurogenese in transgenen Tg4-42-Mäusen genauer zu untersuchen, wurden die mit dem Kryostaten hergestellten Gewebeschnitte (siehe Abschnitt 2.2.3.1) mit einem Antikörper gegen DCX im *free-floating*-Verfahren immunhistochemisch angefärbt. Da diese schonende Färbemethode die Diffusion der Reagenzien erleichterte, konnte das Gewebe gleichmäßig von allen Seiten und unter gutem Erhalt der Morphologie angefärbt werden.

Zuerst erfolgte die zufällige Auswahl eines der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Gläschen aus der Schnittserie eines Mäusehirns, welches jeden Zehnten Schnitt des Hirngewebes einer Maus enthielt. Die Gewebeschnitte wurden nachfolgend direkt in ihrem Glas mit  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem 0,01 M PBS hydriert und gläschenweise separat in spezielle *free-floating*-Siebe überführt, in denen sie zunächst für insgesamt 15 weitere Minuten mit kaltem 0,01 M PBS rehydriert wurden. Zur Blockade endogener Peroxidaseaktivität erfolgte ein 30-minütiger Block in einer Lösung aus 0,01 M PBS und 30%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Anschließend folgten drei je zehnminütige Waschschrte mit 0,01 M PBS und 0,1% Triton zur Permeabilisierung der Zellmembranen, gefolgt von 1 Minute in 0,01 M PBS. Unspezifische Bindestellen wurden durch die nachfolgende einstündige Inkubation in einer Lösung aus 10% FCS mit 4% Milchpulver in 0,01 M PBS bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin erfolgte schließlich die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen DCX (siehe Tabelle 4) in einer Konzentration von 1:4000 mit 10% FCS in 0,01 M PBS über Nacht bei Raumtemperatur.

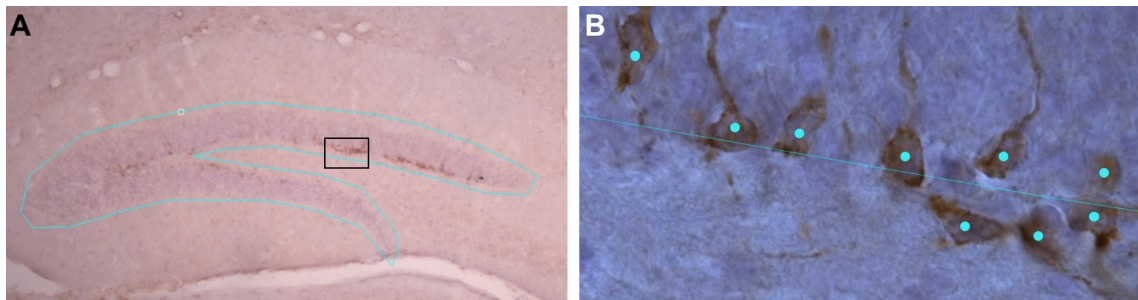
Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut drei Waschgängen von je 10 Minuten in 0,01 M PBS mit 0,1% Triton unterzogen. Nach einer weiteren Minute in 0,01 M PBS wurden die Gewebeschnitte mit dem entsprechenden biotinylierten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 5) in einer Konzentration von 1:250 mit 10% FCS in 0,01 M PBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Inkubation mit der ABC-Lösung, welche aus 10% FCS, Lösung A (1:100) und Lösung B (1:100) in 0,01 M PBS nach Herstellervorgaben präpariert und für mindestens 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, wurden die Schnitte dreimal für jeweils 10 Minuten in 0,01 M PBS gereinigt. Insgesamt verblieben die *free-floating*-Siebe für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in der ABC-Lösung, ehe nochmals drei Waschschrte in 0,01 M PBS folgten, um die Rückstände der ABC-Lösung zu entfernen. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte für 2 Minuten mit DAB-Lösung, welche mittels DAB Peroxidase Substrate Kit gemäß Gebrauchsanweisung hergestellt wurde, gefärbt und erneut dreimal je 10 Minuten in 0,01 M PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

Am letzten Tag der Färbung wurden die Präparate zunächst für 10 Minuten in 0,01 M PBS hydriert und daraufhin für 40 Sekunden mit Hämatoxylin-Lösung gegengefärbt. Im Anschluss wurden sie kurz in destilliertes Wasser eingetaucht und für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült. Die Gewebeschnitte wurden dann mit einer aufsteigenden

Alkoholreihe aus 1 Minute 70%igem Ethanol, 5 Minuten 95%igem Ethanol und 10 Minuten 100%igem Ethanol dehydriert. Nach zweimal jeweils 5 Minuten in Xylol wurden die Präparate abschließend mit synthetischem Einschlußmittel eingebettet und mit Deckgläschen versehen.

#### 2.2.4.2 Analyse der Neurogenese

Zur Analyse der Neurogenese wurden die nach Abschnitt 2.2.4.1 mit dem DCX-Antikörper angefärbten Gewebeschnitte verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe eines Olympus BX51-Mikroskops mit motorisiertem Objektisch und der Software Stereo Investigator 7. Zunächst wurden in vierfacher Vergrößerung des Mikroskops die Anschnitte des GD lokalisiert und wie in Abbildung 6A beispielhaft dargestellt umrandet. Die umrandete Fläche wurde folglich in 100-facher Vergrößerung mithilfe des Meander Scan-Modus der Software systematisch abgefahren und die bräunlich angefärbten Neurone manuell markiert (siehe Abbildung 6B).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Methodik der stereologischen Quantifizierung der Neurogenese.** Die Abbildung **A** zeigt exemplarisch die Markierung des GD, in dessen SGZ sich die in Abbildung **B** dargestellten bräunlich angefärbten Zellen befanden. Bei diesen Zellen handelte es sich um die zur Analyse markierten Perikarya der DCX-positiven Neurone.

Die Anzahl an DCX-positiven Neuronen pro einzeltem Gewebeschnitt ( $N_{\text{Einzel}}$ ) wurden nachfolgend addiert, sodass sich daraus die Anzahl aus allen betrachteten Schnitten ( $N_{\text{Schnitte}}$ ) ergab. Da jedoch nur jeder zehnte Gewebeschnitt eines Maushirns zur Analyse verwendet wurde, musste die Summe aller betrachteten Schnitte ( $N_{\text{Schnitte}}$ ) mit dem Faktor 10 multipliziert werden, um die Gesamtzahl DCX-positiver Neurone ( $N_{\text{gesamt}}$ ) in der SGZ des GD innerhalb einer Hirnhemisphäre zu erhalten.

## 2.2.5 Quantifizierung der Mikro- und Astroglie

### 2.2.5.1 Schneiden am Mikrotom

Für die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wurden die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen rechten Großhirnhemisphären der Mäuse in Paraffin eingebettet und mithilfe eines Rotationsmikrotoms geschnitten.

Hierfür wurden die Paraffinblöcke zuerst für einige Minuten auf einer Kühlplatte heruntergekühlt und anschließend ins Mikrotom eingespannt. Das Gewebe wurde nachfolgend in sagittaler Ebene mit einer Schnittdicke von  $4\ \mu\text{m}$  geschnitten und die einzelnen Paraffinschnitte vorsichtig in ein kaltes Wasserbad befördert. Darin wurde das Gewebe auf Objektträger gezogen und zur Falten glättung in ein  $53^{\circ}\text{C}$  heißes Wasserbad überführt. Bevor die Schnitte nun gefärbt werden konnten, wurden sie über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

### 2.2.5.2 3,3'-Diaminobenzidin-Immunhistochemie

Die nach Abschnitt 2.2.5.1 erstellten Paraffinschnitte wurden zur Quantifizierung der Mikro- bzw. Astroglie mit den primären Antikörpern IBA-1 und GFAP (siehe Tabelle 4) angefärbt.

Dafür wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimalig in Xylol für jeweils 5 Minuten deparaffiniert und anschließend mittels absteigender Alkoholreihe hydriert: anfangs für 10 Minuten in 100%igem Ethanol, gefolgt von jeweils 5 Minuten in 95%igem und 70%igem Ethanol. Darauf folgte 1 Minute in destilliertem Wasser. Zur Blockade endogener Peroxidasen erfolgte ein 30-minütiger Peroxidaseblock aus 200 ml 0,01 M PBS mit 2 ml 30%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  und darauf erneut 1 Minute in destilliertem Wasser. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 10 Minuten in 10 mM Citratpuffer in der Mikrowelle erhitzt (2 Minuten bei 800 W; 8 Minuten bei 80 W) und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen gelassen. Es folgten Waschschrte von 1 Minute in destilliertem Wasser, gefolgt von 15 Minuten in 0,01 M PBS mit 0,1% Triton zur Permeabilisierung der Zellmembran und abschließend 1 Minute in 0,01 M PBS. Als nächstes wurden die Gewebeschnitte für 3 Minuten mit 88%iger Ameisensäure behandelt und erneut zwei Waschkvorgängen mit 0,01 M PBS unterzogen. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umkreist und nicht-spezifische Proteinbindestellen für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur durch einen unspezifischen Block aus 4% Milchpulver und 10% FCS in 0,01 M PBS geblockt. Die Schnitte wurden nachfolgend mit den primären Antikörpern IBA-1 bzw. GFAP, die jeweils in einer Konzentration von 1:1000 mit 10% FCS in 0,01 M PBS eingesetzt wurden, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

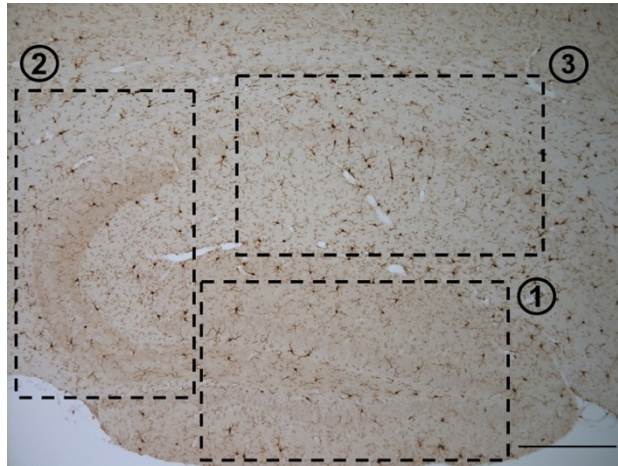
Am nächsten Tag wurden die Gewebeschnitte zuerst für 15 Minuten in 0,01 M PBS mit 0,1% Triton und eine weitere Minute in 0,01 M PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden biotinylierten sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 5) in

einer Konzentration von 1:200 mit 10% FCS in 0,01 M PBS für 1 Stunde bei 37°C im Trockenschrank. Während dieser Inkubationszeit wurde die nachfolgend benötigte ABC-Lösung bestehend aus 10% FCS, Lösung A (1:100) und Lösung B (1:100) in 0,01 M PBS nach Gebrauchsanweisung des Herstellers präpariert und für mindestens 30 Minuten bei 4°C gelagert. Auf einen weiteren 15-minütigen Waschschrift mit 0,01 M PBS erfolgte nun die Inkubation mit der vorbereiteten ABC-Lösung für 1,5 Stunden bei 37°C. Nachdem die Schnitte erneut für etwa 15 Minuten in 0,01 M PBS gewaschen wurden, um die Rückstände der ABC-Lösung zu entfernen, erfolgte die Färbung mit der DAB-Lösung, welche mittels DAB Peroxidase Substrate Kit gemäß Gebrauchsanweisung hergestellt wurde. Die Schnitte wurden dabei unter mikroskopischer Kontrolle mit etwa 100 µl DAB-Lösung inkubiert, bis die gewünschte Färbung der Zielstrukturen auftrat. Die ermittelte individuelle Färbedauer wurde nachfolgend auf Gewebeschnitte mit derselben Antikörperfärbung übertragen. Anschließend wurden die Schnitte einem erneuten 15-minütigen Waschschrift in 0,01 M PBS unterzogen und für 40 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Daraufhin wurden sie kurz in destilliertes Wasser eingetaucht und für 5 Minuten mit fließendem Leitungswasser abgespült. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 1 Minute 70%igem Ethanol, 5 Minuten 95%igem Ethanol und 10 Minuten 100%igem Ethanol wurden die Schnitte dehydriert und nach zweimal 5 Minuten in Xylol abschließend mit synthetischem Einschlussmittel eingebettet und mit Deckgläschen abgedeckt.

#### 2.2.5.3 Analyse der Mikro- und Astrogliose

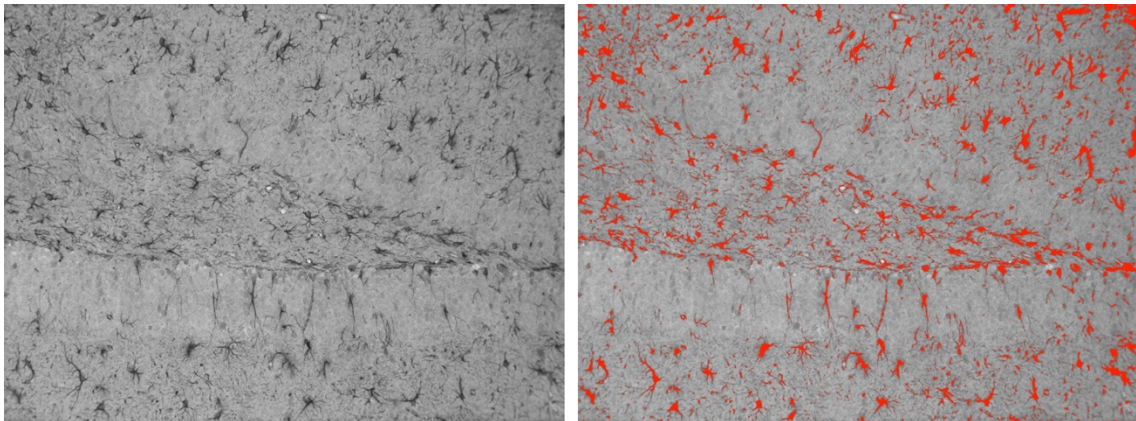
Die Mikro- bzw. Astrogliose wurde in den nach Abschnitt 2.2.5.2 angefärbten Paraffinschnitten im Bereich des Hippocampus mithilfe eines Olympus BX51-Mikroskops, das mit einer MoticamPro 282B Digitalkamera ausgestattet war, untersucht. Durch die Auswahl der primären Antikörper (siehe Tabelle 4) konnten die betreffenden Strukturen gezielt angefärbt werden: Der Antikörper IBA-1 ist gegen ein Mikroglia-spezifisches Calcium-Bindeprotein gerichtet (Ohsawa et al. 2004), wohingegen sich der Antikörper GFAP gegen das saure Gliafaserprotein richtet, welches als Bestandteil von Intermediärfilamenten im Zytoplasma von Gliazellen vorkommt (Eng et al. 2000).

Zur Quantifizierung wurden pro Maushirn für jede Antikörperfärbung drei gefärbte Schnitte ausgewählt, die einen Abstand von etwa 30 µm zueinander aufwiesen. Von jedem Gewebeschnitt wurden nachfolgend in 20-facher Vergrößerung Bilder von unterschiedlichen Regionen des Hippocampus aufgenommen (siehe Abbildung 7): GD, CA2- und CA3-Region sowie von der CA1-Region. Die Bilder für den jeweiligen Antikörper wurden dabei unter konstanten Mikroskop- und Belichtungseinstellungen aufgenommen.



**Abbildung 7: Schema der Bildaufnahme zur Quantifizierung der Neuroinflammation.** Die Abbildung zeigt exemplarisch anhand eines mit dem Antikörper IBA-1 angefärbten Gewebeschnittes eine Übersicht des Hippocampus. Die nummerierten Rechtecke stehen für die Bildausschnitte, welche der Auswertung zugrunde gelegt wurden: (1) GD, (2) CA2/3-Region und (3) CA1-Region. Maßstab: 200 µm.

Anschließend wurden die Aufnahmen mithilfe der Software ImageJ in ein 8-bit schwarz-weiß Format konvertiert und ein an das DAB-Signal angepasster Schwellenwert (nachfolgend *Threshold* genannt) für die beiden Antikörperfärbungen festgelegt (siehe Abbildung 8). Folglich konnte so der von positiver DAB-Färbung bedeckte prozentuale Anteil an der Gesamtfläche eines jeden Bildes ermittelt werden. Aufnahmen mit Artefakten, welche nicht durch den gewählten *Threshold* ausgeglichen werden konnten, waren von den weiteren Berechnungen ausgenommen.



**Abbildung 8: Schwellenwert zur Quantifizierung der neuroinflammatorischen Prozesse.** Die linke Abbildung stellt exemplarisch die in ein 8-bit schwarz-weiß Format konvertierte Aufnahme eines mit GFAP angefärbten Gyrus dentatus-Bereichs dar. Zur Analyse der Astroglieose wurde ein Schwellenwert (*Threshold*) von 110 angewandt. Die rotmarkierte Fläche in der rechten Abbildung zeigt das positive DAB-Signal, welches als prozentualer Anteil der Gesamtfläche die Grundlage für die sich anschließenden Berechnungen bildete. Für die Evaluation der Mikroglieose wurde ein *Threshold* von 120 festgelegt (hier nicht bildlich veranschaulicht).

Für die nachfolgende Kalkulation wurden die aus ImageJ erhaltenen Rohdaten auf die Vergleichsgruppe aus WT-Tieren normalisiert. Dazu wurde aus den Werten aller WT-Mäuse ein Mittelwert (Normalisierungsfaktor) gebildet, durch den die einzelnen Werte der transgenen Mäuse dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert wurden. Anschließend wurden aus den normalisierten Prozentwerten der drei Gewebeschnitte pro Tier jeweils ein Mittelwert für die untersuchten Regionen (GD, CA2/3 und CA1) gebildet. Folglich wurden drei Mittelwerte pro Tier, die jeweils für eine der oben genannten Regionen des Hippocampus stehen, der Auswertung mit GraphPad Prism zugrunde gelegt.

#### 2.2.5.4 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten

Um die neuroinflammatorischen Prozesse in transgenen Mäusen besser visualisieren zu können, wurden die nach Abschnitt 2.2.5.1 mittels Rotationsmikrotom erstellten Paraffinschnitte einer Fluoreszenzfärbung unterzogen. Verwendet wurden hierzu die primären Antikörper IBA-1 und GFAP (siehe Tabelle 4), um die Mikro- bzw. Astroglie anzufärben sowie der humanisierte A $\beta$ -Antikörper Solanezumab<sub>BS</sub> (ebenfalls Tabelle 4).

Zu Beginn erfolgte die Deparaffinierung des Gewebes durch zweimal 5 Minuten in Xylol. Anschließend wurden die Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe hydriert (10 Minuten in 100%igem Ethanol, 5 Minuten in 95%igem Ethanol, 5 Minuten in 70%igem Ethanol) und für 1 Minute in destilliertes Wasser gestellt. Um die Immunreaktivität des Gewebes zu erhöhen wurden die Präparate zur Epitop-Demaskierung für 10 Minuten in 10 mM Citratpuffer in der Mikrowelle erhitzt (etwa 2 Minuten bei 800 W, dann 8 Minuten bei 80 W) und im Anschluss für 15 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen gelassen. Darauffolgend wurden die Gewebeschnitte zuerst 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen und für 15 Minuten einer Lösung aus 0,01 M PBS mit 0,1% Triton ausgesetzt. Nach 1 Minute in 0,01 M PBS-Lösung erfolgte eine dreiminütige Inkubation in 88%iger Ameisensäure, der sich eine weitere Minute in 0,01 M PBS anschloss. Als nächstes wurden unspezifische Proteinbindestellen durch die einstündige Inkubation mit 4% Milchpulver und 10% FCS in 0,01 M PBS geblockt. Im Anschluss wurden die jeweiligen primären Antikörper mit 10% FCS in 0,01 M PBS auf die entsprechenden Gewebeschnitte gegeben. Hierbei wurde sowohl IBA-1 (1:500) als auch GFAP (1:1000) mit dem humanisierten A $\beta$ -Antikörper Solanezumab<sub>BS</sub> (1:2500) kombiniert. Folglich konnten sich die primären Antikörper über Nacht bei Raumtemperatur an ihre Zielstrukturen anlagern.

Am darauffolgenden Tag wurde das Gewebe zunächst einem 15-minütigen Waschschrift in 0,01 M PBS mit 0,1% Triton gefolgt von einem weiteren in 0,01 M PBS zugeführt. Dann schloss sich die Inkubation mit den entsprechenden fluoreszierenden sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 5), die jeweils in einer Konzentration von 1:200 mit 10% FCS in 0,01 M PBS verwendet wurden, für 1,5 Stunden bei 37°C an. Es folgten drei weitere Waschvorgänge zu je 5 Minuten in 0,01 M PBS unter lichtgeschützten Bedingungen. Die Präparate wurden anschließend mittels Roti®-Mount FluorCare DAPI, einem speziellen Einschlussmedium

für Fluoreszenzfärbungen, unter gleichzeitiger Gegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingebettet.

Die verwendeten Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit einem Nikon E-CLIPSE Ti Mikroskop, das mit einer DS-Qi2 Kamera ausgestattet war, aufgenommen und nachfolgend mithilfe der Software Nikon NIS-Elements AR bearbeitet.

### 2.3 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 6. Neben einfachen Varianzanalysen (*one-way* ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur wurden auch ungepaarte t-Test-Analysen durchgeführt.

Die Signifikanzniveaus werden jeweils bei den betreffenden Analysen wie nachfolgend genannt angegeben: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ . Alle Daten werden dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM). Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere (n) wird unter den jeweiligen Abbildungen angegeben.

### 2.4 Software

In der nachfolgenden Tabelle 9 werden die verwendeten Computerprogramme aufgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete Software**

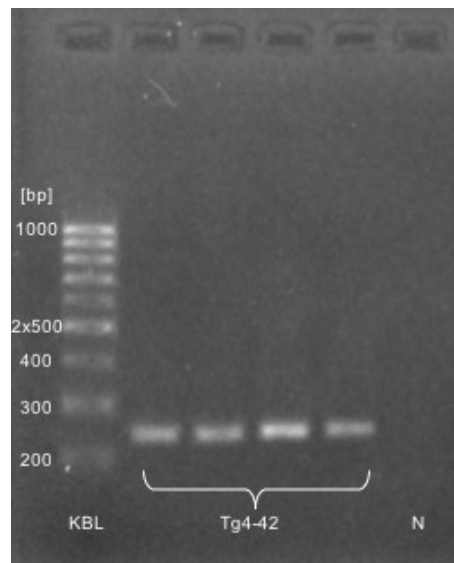
Software	Hersteller
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, USA
Image Studio Version 3.1	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA
ImageJ 1.51s	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, USA
Motic Images Plus 2.0	Motic Asia, Kowloon, Hong Kong, CHN
Nikon NIS-Elements AR Imaging Software	Nikon Corporation, Tokio, JPN
Stereo Investigator 7	MicroBrightField Bioscience, Williston, USA



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Nachweis des Transgens in homozygoten Tg4-42-Mäusen

Um sicherzustellen, dass es sich bei den verwendeten Mäusen um homozygote Tiere aus der Tg4-42-Mauslinie handelte, wurde stichprobenartig bei einigen von ihnen das Transgen, wie in Absatz 2.2.1 beschrieben, gelelektrophoretisch nachgewiesen. Die Abbildung 9 zeigt exemplarisch die nachweisbaren Nukleinsäurebanden im Bereich von 248 bp bei homozygoten Tg4-42-Mäusen.

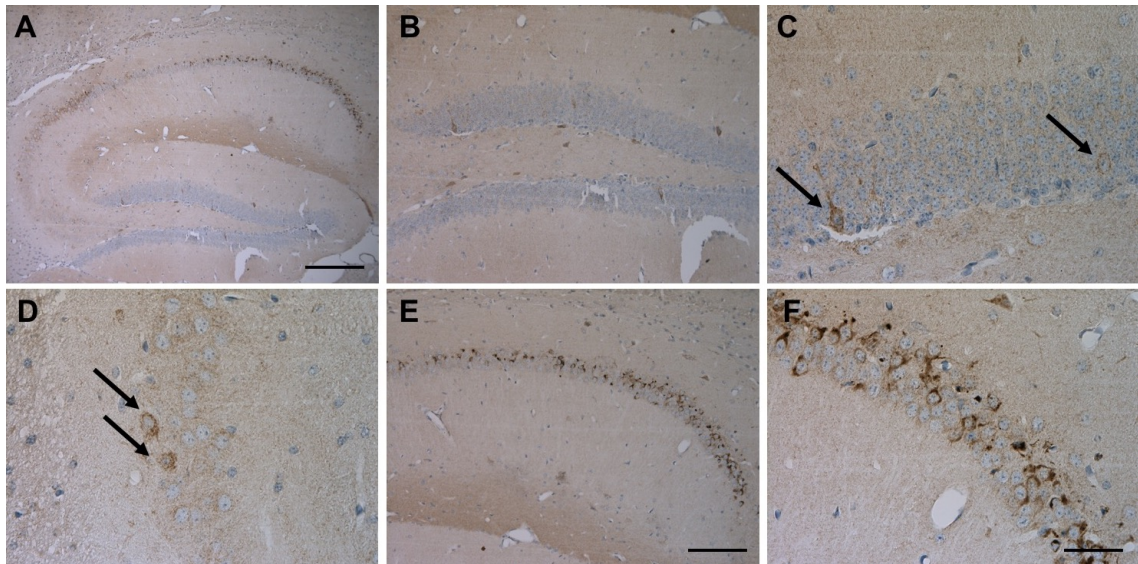


**Abbildung 9: Gelelektrophoretischer Nachweis des Transgens bei homozygoten Tg4-42-Mäusen.** Die Tg4-42-Tiere zeigen eine für ihre DNA-Sequenz charakteristische Nukleinsäurebande bei 248 bp. KBL = 100 bp DNA Ladder; Tg4-42 = typische Bande für einzelne homozygote Tg4-42-Mäuse; N = Negativkontrolle.

### 3.2 $A\beta_{42}$ -Expression in Regionen des Hippocampus im Tg4-42-Mausmodell

Die  $A\beta_{42}$ -Expression wurde, wie in Absatz 2.2.2 beschrieben, mithilfe des  $A\beta_{42}$ -spezifischen Antikörpers Abeta42 (siehe Tabelle 4) untersucht. In Abbildung 10 ist diese Expression exemplarisch für einige Hippocampusregionen einer drei Monate alten homozygoten Tg4-42-Maus dargestellt.

Vor allem die CA1-Region des Hippocampus wies eine sehr starke Immunreaktivität gegenüber  $A\beta_{42}$  auf (Abbildung 10E und F), wie bereits durch Y Bouter et al. (2013) in jungen, hemizygoten Tg4-42-Mäusen gezeigt werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich vereinzelt auftretendes intraneurales  $A\beta$  im Bereich des GD (Abbildung 10B und C). Auch in der CA3-Region des Hippocampus konnten schwach angefärbte  $A\beta_{42}$ -Ablagerungen nachgewiesen werden (Abbildung 10D).

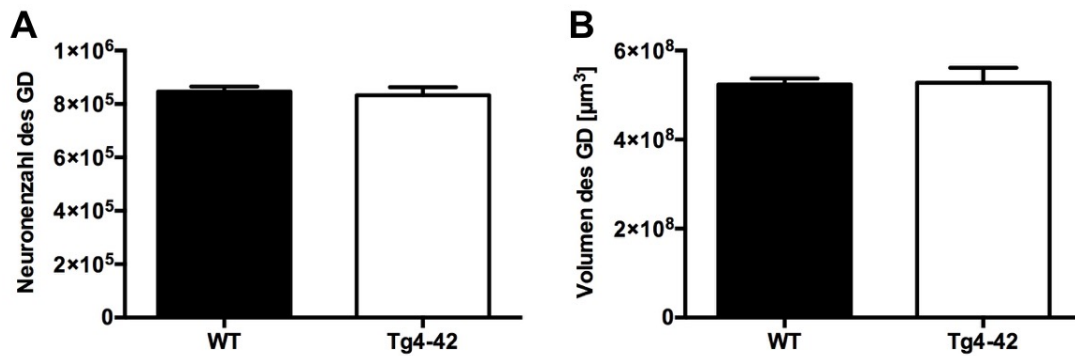


**Abbildung 10: A $\beta$ <sub>42</sub>-Expression im Bereich des Hippocampus bei Tg4-42-Mäusen.** Dargestellt ist die intraneuronale Ansammlung von A $\beta$ <sub>42</sub> in einem dreimonatigen homozygoten Tier der Tg4-42-Mauslinie. (A) Übersicht des Hippocampus. Vereinzelt auftretendes A $\beta$  im GD (B-C) und der CA3-Region (D). (E-F) In der CA1-Region des Hippocampus zeigt sich eine starke A $\beta$ <sub>42</sub>-Expression. Antikörper: Abeta42 (1:500). Maßstab: (A) = 200  $\mu\text{m}$ ; (B, E) = 100  $\mu\text{m}$ ; (C, D, F) = 33  $\mu\text{m}$ . Einzelne Bildausschnitte wurden bereits durch C Bouter et al. (2018) publiziert und werden hier in modifizierter Form dargestellt.

### 3.3 Vergleichende Analyse der Neuronenzahl sowie des Volumens im Bereich des GD von dreimonatigen Tg4-42-Mäusen mit gleichaltrigen WT-Tieren

In vorangegangenen Untersuchungen konnte insbesondere in der CA1-Region des Hippocampus ein ausgeprägter altersabhängiger Neuronenverlust bei homozygoten Tg4-42-Mäusen nachgewiesen werden, welcher ab einem Mausalter von fünf Monaten signifikant gegenüber dreimonatigen WT-Tieren war (Antonios et al. 2015). Zur weiteren Evaluation des genannten Mausmodells mit Fokus auf den Bereich des GD wurden die Neuronenzahl sowie das Volumen des GD von dreimonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen mit gleichaltrigen WT-Tieren stereologisch, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, vergleichend analysiert.

Bei dieser stereologischen Auswertung konnte zwischen den beiden Kohorten in Bezug auf die Nervenzellzahl kein signifikanter Unterschied (ungepaarter t-Test,  $p = 0,7343$ ) ermittelt werden (Abbildung 11A, Mittelwerte: WT = 845890,  $\pm$  SEM 19797; Tg4-42 = 832770, SEM  $\pm$  30124). Nachfolgend fanden sich ebenfalls keine signifikanten Volumenabweichungen des GD in den oben genannten Gruppen (Abbildung 11B, ungepaarter t-Test,  $p = 0,9244$ , Mittelwerte: WT =  $5,239 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $1,318 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ; Tg4-42 =  $5,275 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $3,379 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ).



**Abbildung 11: Vergleich von Neuronenzahl und Volumen des GD bei dreimonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen mit gleichaltrigen WT-Tieren.** Die Abbildung **A** zeigt eine Gegenüberstellung der stereologisch ermittelten Nervenzellzahl im GD der transgenen Mauslinie mit gleichaltrigen WT-Tieren. In Abbildung **B** werden die oben genannten Gruppen hinsichtlich ihres Volumens des GD verglichen. In beiden Analysen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Jeweils ungepaarter t-Test.  $n = 3$  pro Gruppe (WT:  $n = 3$ , Tg4-42:  $n = 3$ ). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.

### 3.4 Einfluss der Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X auf die Neuronenzahl und das Volumen im Tg4-42-Mausmodell

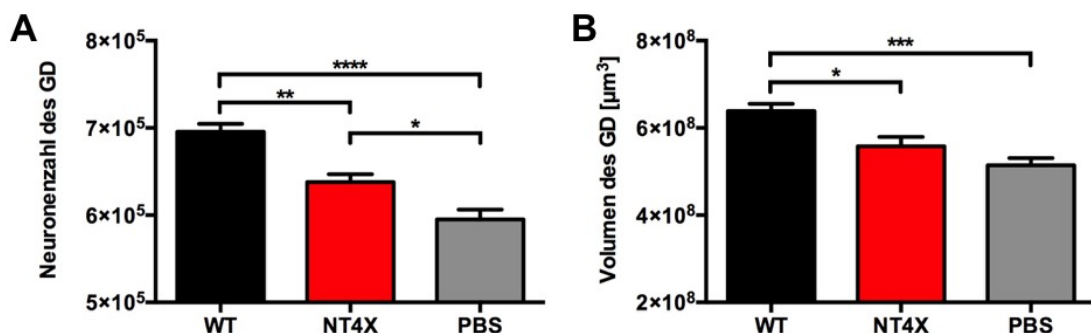
In vorangegangenen Experimenten konnte bereits ein therapeutischer Effekt der Immunisierung gezeigt werden, indem mittels NT4X behandelte sechsmonatige homozygote Tg4-42-Mäuse signifikant mehr Neurone in der CA1-Region des Hippocampus aufwiesen als eine gleichaltrige Kontrollgruppe aus PBS-Tieren (Antonios et al. 2015). Um das therapeutische Potenzial des Antikörpers am Tg4-42-Mausmodell weiter zu evaluieren wurde die Nervenzellzahl sowie das Volumen des GD und der CA2/3-Region des Hippocampus quantifiziert. Diese Quantifizierung erfolgte mithilfe der in Abschnitt 2.2.3.3 beschriebenen Methodik der design-basierten Stereologie. Dabei wurde die Neuronenzahl bzw. das Volumen in den oben genannten Regionen von sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen, die mit dem NT4X-Antikörper immunisiert wurden, und einer Kontrollgruppe aus PBS-Tieren mit unbehandelten gleichaltrigen WT-Mäusen verglichen.

#### 3.4.1 Neuronenzahl und Volumen des GD

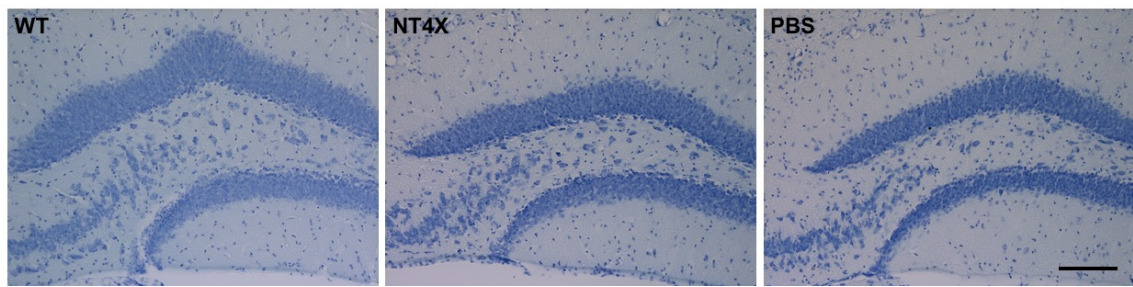
Die Analyse der Nervenzellzahl im Bereich des GD zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 12A, Einfache Varianzanalyse,  $p < 0,0001$ ). Im Vergleich zu den unbehandelten WT-Tieren, welche die meisten Neurone im GD aufwiesen, lagen bei der Kontrollgruppe aus PBS-Mäusen signifikant weniger Nervenzellen vor ( $p < 0,0001$ , Mittelwerte: WT = 695651,  $\pm$  SEM 9029; PBS = 595016,  $\pm$  SEM 11308). Ebenso konnte ein geringerer Unterschied von den WT-Mäusen gegenüber den mit NT4X immunisierten Tieren beobachtet werden ( $p = < 0,01$ , Mittelwert: NT4X = 637763,  $\pm$  SEM

9219). Ausgehend von den unbehandelten WT-Mäusen zeigte sich bei den mit PBS behandelten Mäusen ein prozentualer Nervenzellverlust von 14,47%, wohingegen die mit NT4X immunisierten Tieren nur rund 8,32% weniger Neurone aufwiesen. Innerhalb der transgenen Gruppen ließ sich im Mittel eine absolute Differenz von 42720 Neuronen von PBS- zu NT4X-Mäusen nachweisen, was einem prozentualen Unterschied von ca. 7% entsprach.

In der nachfolgenden Auswertung wurden die jeweiligen Volumina des GD der oben genannten Gruppen miteinander verglichen (Abbildung 12B, Einfache Varianzanalyse,  $p = 0,0004$ ). Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied des Volumens von der unbehandelten WT-Kohorte zu den PBS-Tieren ( $p < 0,001$ , Mittelwerte: WT =  $6,389 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $1,623 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ; PBS =  $5,141 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $1,681 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ). Die Volumendifferenz von WT-Tieren zu immunisierten NT4X-Mäusen war vergleichsweise geringer ausgeprägt ( $p < 0,05$ , Mittelwert: NT4X =  $5,577 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $2,137 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ). Insgesamt zeigten die PBS-Tiere ausgehend von den WT-Tieren eine relative Volumenreduktion von 19,52%, wogegen diese bei den mit NT4X behandelten Mäusen nur ca. 12,71% betrug. Zwischen den beiden transgenen Gruppen konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied des Volumens erhoben werden.



**Abbildung 12: Behandlungseffekt der passiven Immunisierung mit NT4X auf die Nervenzellzahl und das Volumen des GD bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen.** Die Quantifizierung der Nervenzellzahl sowie des jeweiligen Volumens erfolgte mittels design-basierter Stereologie. Dargestellt ist in Abbildung A ein Vergleich der Neuronenzahl im GD von unbehandelten WT-Tieren mit immunisierten NT4X-Mäusen und einer transgenen Kontrollgruppe, der PBS injiziert wurde. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der WT-Kohorte und den beiden anderen Mausgruppen. Die mittels NT4X behandelten transgenen Mäuse wiesen rund 7% mehr Nervenzellen im GD auf als ihre PBS-Vergleichsgruppe. Die Abbildung B stellt die verglichen mit den WT-Mäusen bei den transgenen Tieren zu verzeichnenden Volumendefizite dar, die sich im Mittel in der PBS-Gruppe ausgeprägter zeigten. Zwischen den transgenen Mausgruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Volumens ermittelt werden. Jeweils einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur.  $n = 7-8$  pro Gruppe (WT:  $n = 7$ , NT4X:  $n = 7$ , PBS:  $n = 8$ ). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.

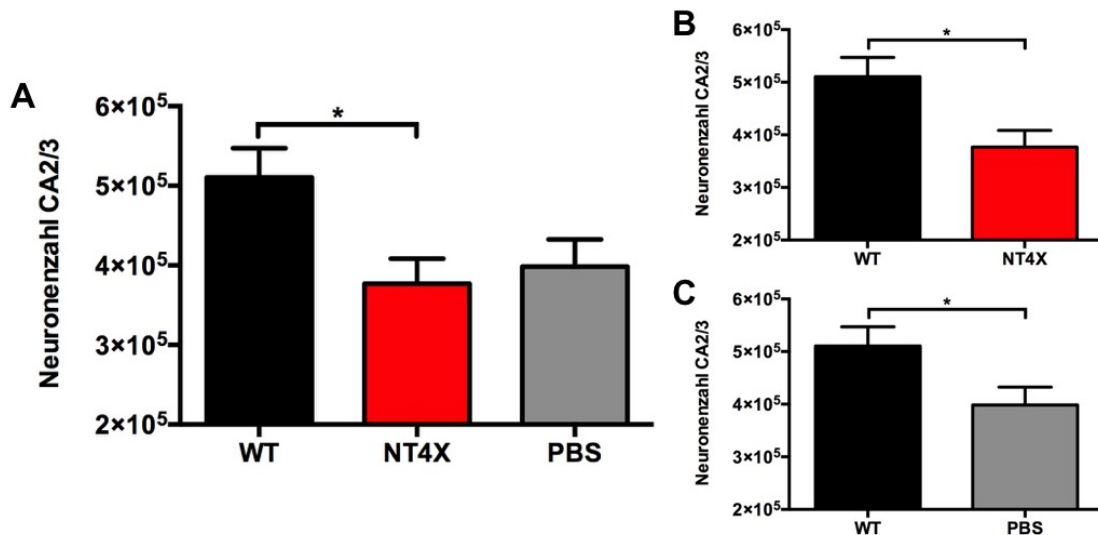


**Abbildung 13: Vergleichende Übersicht des GD.** Die abgebildeten Gewebeschnitte wurden zur Darstellung der Neuronen mit Kresylviolett angefärbt (siehe Absatz 2.2.3.2). Die Bildausschnitte zeigen jeweils einen ähnlichen Anschnitt des Gyrus dentatus bei einem sechsmonatigen WT-Tier (hier WT), einem gleichaltrigen NT4X-immunisierten Tier (hier NT4X) sowie einem gleichaltrigen PBS-Tier (hier PBS). Im direkten Vergleich wirkt der GD bei dem WT-Tier deutlich voluminöser ausgeprägt und mit einem dichter erscheinenden Neuronenverband. Dies steht in guter Korrelation mit den stereologisch erhobenen Befunden. Zwischen den beiden transgenen Mausgruppen zeigen sich bildmorphologisch allenfalls marginale Unterschiede in der Nervenzell-dichte zugunsten der NT4X-immunisierten Tiere. Maßstab: 100  $\mu$ m.

### 3.4.2 Neuronenzahl und Volumen in der CA2/3-Region des Hippocampus

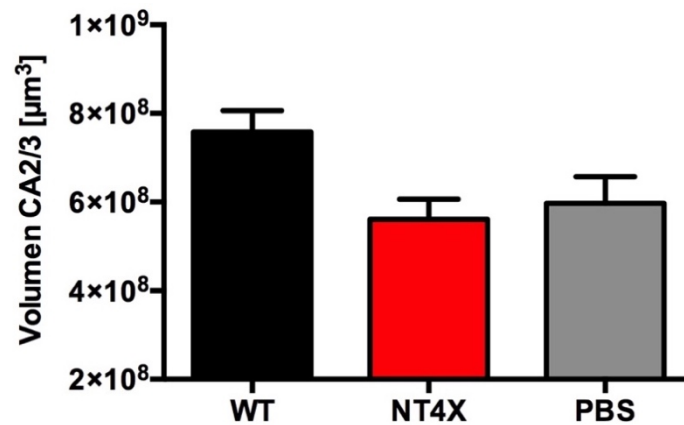
Die Auswertung der Neuronenzahl im Bereich der CA2/3-Region des Hippocampus ergab in der einfachen Varianzanalyse (Abbildung 14A,  $p = 0,0317$ ) einen signifikanten Unterschied zwischen den WT-Mäusen und den mit dem NT4X-Antikörper behandelten Tieren ( $p < 0,05$ , Mittelwerte: WT = 510492,  $\pm$  SEM 36819; NT4X = 376901,  $\pm$  SEM 31719; PBS = 398338,  $\pm$  SEM 34074). Sowohl die immunisierten NT4X-Mäuse (t-Test,  $p = 0,0205$ ) als auch die PBS-Kontrollgruppe (ungepaarter t-Test,  $p = 0,0494$ ) zeigten in ergänzend durchgeführten ungepaarten t-Tests signifikante Nervenzellverluste gegenüber den gleichaltrigen unbehandelten WT-Tieren (siehe Abbildung 14B und C). Die Nervenzellzahl war ausgehend von den WT-Tieren bei der PBS-Kontrollgruppe im Mittel um fast 22% reduziert; bei den NT4X-Mäusen sogar um rund 26%. Zwischen den beiden transgenen Kohorten konnte direkt jedoch kein statistisch signifikanter Neuronenunterschied erhoben werden (ungepaarter t-Test,  $p = 0,6550$ , hier nicht dargestellt).



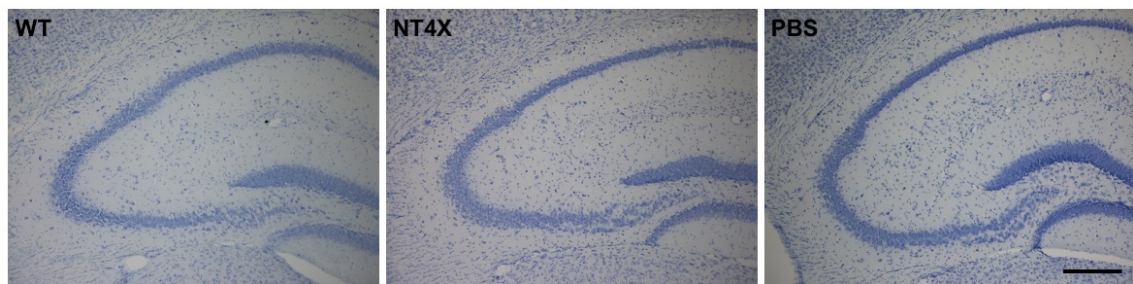


**Abbildung 14: Reduzierte Nervenzellzahl in der CA2/3-Region des Hippocampus bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen.** Die Abbildung **A** vergleicht die stereologisch quantifizierte Neuronenzahl der WT-Gruppe mit den beiden transgenen Kohorten. In der durchgeführten einfachen Varianzanalyse ergab sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen den WT-Mäusen und den NT4X-Tieren. In Abbildung **B** und **C** sind ergänzend die jeweiligen t-Tests dargestellt. Beide transgene Gruppen weisen in der CA2/3-Region signifikant weniger Nervenzellen als die gleichalten WT-Mäuse auf. (A) Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. (B) und (C) Ungepaarter t-Test.  $n = 6$  pro Gruppe (WT:  $n = 6$ , NT4X:  $n = 6$ , PBS:  $n = 6$ ). Daten jeweils dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.

Zur Beurteilung des Volumens in der CA2/3-Region der oben genannten Kohorten wurde ebenfalls eine einfache Varianzanalyse durchgeführt (Abbildung 15,  $p = 0,0382$ ). Hierbei konnten unter Bonferroni-Korrektur zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Volumens festgestellt werden (Mittelwerte: WT =  $7,575 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $4,859 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ; NT4X =  $5,608 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $4,549 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ; PBS =  $5,973 \times 10^8$ ,  $\pm$  SEM  $5,995 \times 10^7 \mu\text{m}^3$ ). Es zeigte sich lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied in einem nachfolgend durchgeführten ungepaarten t-Test zwischen den WT-Tieren und den NT4X-immunisierten Mäusen (ungepaarter t-Test,  $p = 0,0144$ , nicht abgebildet).



**Abbildung 15: Vergleich des Volumens in der CA2/3-Region des Hippocampus.** In der durchgeführten einfachen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur zeigten sich zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.  $n = 6$  pro Gruppe (WT:  $n = 6$ , NT4X:  $n = 6$ , PBS:  $n = 6$ ). Daten jeweils dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.

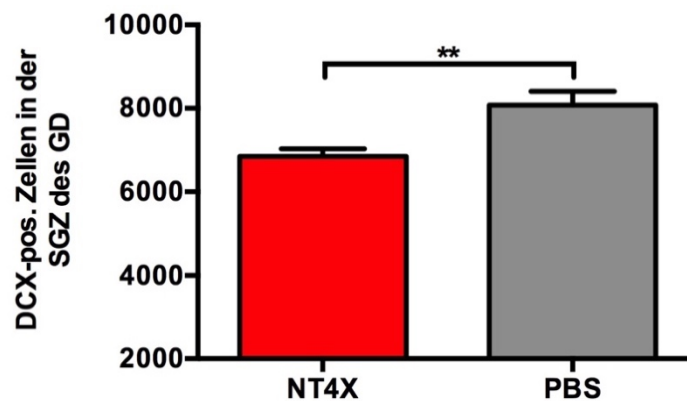


**Abbildung 16: Gegenüberstellende Darstellung der CA2/3-Region des Hippocampus.** Die abgebildeten Gewebeschnitte wurden ebenfalls zur Veranschaulichung der Nervenzellen mit Kresylviolett angefärbt (siehe Absatz 2.2.3.2). Die Bildausschnitte stellen jeweils einen ähnlichen Abschnitt der CA2/3-Region des Hippocampus sowohl bei einem sechsmonatigen WT-Tier (hier WT), einem gleichaltrigen NT4X-immunisierten Tier (hier NT4X) als auch einem gleichaltrigen PBS-Tier (hier PBS) dar. Insbesondere in der CA1-Region des Hippocampus zeigt sich bei den beiden transgenen Mäusen ein deutlich schmaler und dünner erscheinendes Neuronenband im Vergleich zu dem WT-Tier. Hinsichtlich der CA2/3-Region lassen sich bildmorphologisch hingegen keine eindeutigen Unterschiede evaluieren. Maßstab:  $200 \mu\text{m}$ .

### 3.5 Neurogenese in der SGZ des GD unter der passiven Immunisierung mit NT4X

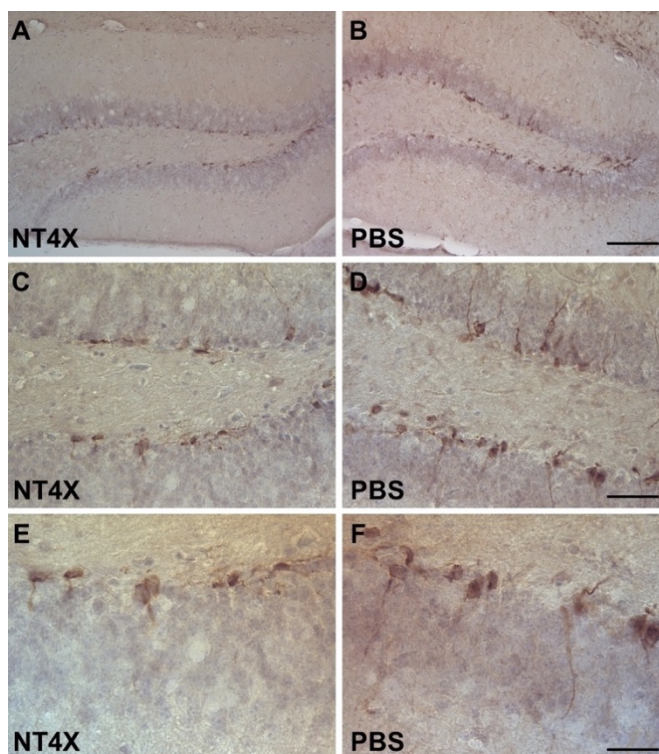
Um den Einfluss der passiven Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X auf die Neurogenese bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen zu evaluieren, wurden die Gewebeschnitte, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, mit einem Antikörper gegen DCX (siehe Tabelle 4) angefärbt. Die Quantifizierung der DCX-positiven Zellen ermöglicht eine valide Aussage über die jeweils vorliegende Neurogeneserate (Couillard-Despres et al. 2005).

In der nachfolgenden Auswertung wurden die beiden transgenen Mausgruppen (bestehend aus NT4X-immunisierten Mäusen und der PBS-Vergleichsgruppe) einander gegenübergestellt. Es zeigte sich zwischen den Kohorten ein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die Anzahl der DCX-positiven Zellen (ungepaarter t-Test,  $p = 0,0050$ ). Die mit PBS behandelten Tiere wiesen im Vergleich eine signifikant ausgeprägtere Neurogenese in der SGZ des GD auf als die mit dem Antikörper NT4X immunisierten Mäuse (Mittelwerte: PBS = 8075,  $\pm$  SEM 325,4; NT4X = 6.846,  $\pm$  SEM 175,5). Ausgehend von der PBS-Gruppe entsprach dies einer absoluten mittleren Differenz von 1229 DCX-positiven Zellen und einem relativen Unterschied von rund 15%.



**Abbildung 17: Analyse der Neurogenese unter der Immunisierung mit dem Antikörper NT4X.** Die Abbildung zeigt die stereologisch quantifizierte Zahl der DCX-positiven Zellen in der SGZ des GD bei immunisierten NT4X-Mäusen und der PBS-Vergleichskohorte. Die mit PBS behandelte Gruppe aus homozygoten sechsmonatigen Tg4-42-Mäusen exprimierte fast 18% mehr DCX-positive Zellen als die mit dem NT4X-Antikörper immunisierten Tiere. Ungepaarter t-Test.  $n = 8$  pro Gruppe (NT4X:  $n = 8$ , PBS:  $n = 8$ ). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.





**Abbildung 18: Exemplanische bildliche Gegenüberstellung der Neurogenese in der SGZ des GD.** Die Abbildung stellt exemplarisch die mittels DCX-Antikörper angefarbten Zellen im Bereich des GD bei den oben genannten transgenen Mausgruppen vergleichend dar. Insbesondere die Detailaufnahmen des PBS-Tieres zeigen deutlich mehr bräunlich angefarbte Perikarya mit ihren weitläufigen Axonen als die Aufnahmen der mit NT4X immunisierten Maus. Antikörper: Doublecortin (1:4000). Maßstab: (A, B) = 100 µm; (C, D) = 33 µm; (E, F) = 20 µm.

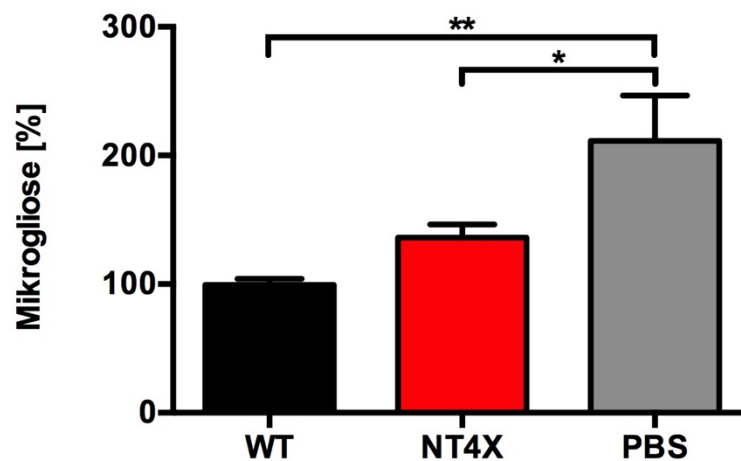
### 3.6 Neuroinflammatorische Prozesse im Bereich des Hippocampus

Um den Einfluss der passiven Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X auf die neuroinflammatorischen Prozesse im Hippocampusbereich von sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen zu evaluieren, wurde die Mikro- und Astrogliose in den transgenen Tieren, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, quantifiziert. Hierzu wurden einer Kohorte aus unbehandelten sechsmonatigen WT-Tieren die beiden gleichalten transgenen Tiergruppen, bestehend aus den mit NT4X behandelten Mäusen sowie den PBS-Vergleichstieren, gegenübergestellt. Die Werte der WT-Mäuse wurden in den nachfolgenden Analysen auf 100% normalisiert, sodass von ihnen ausgehend der therapeutische Effekt beurteilt werden konnte.

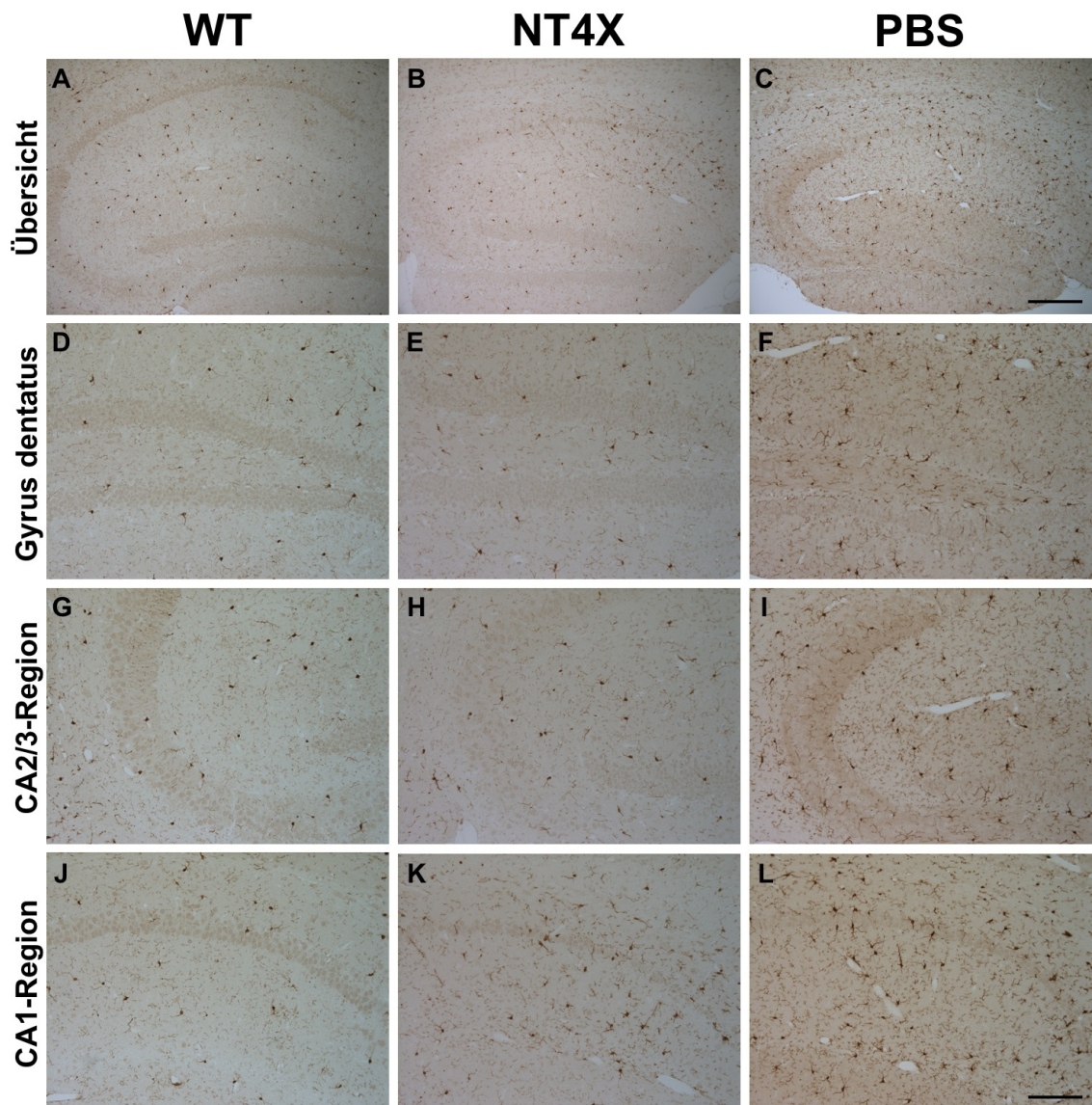
### 3.6.1 Analyse der Mikrogliose

Zur Analyse der Mikrogliose wurde der Antikörper IBA-1 (siehe Tabelle 4) verwendet, welcher gegen ein Mikroglia-spezifisches Calcium-Bindeprotein gerichtet ist (Ito et al. 1998; Ohsawa et al. 2004).

Bei der Auswertung der relativen Mikrogliose konnten statistisch signifikante Unterschiede erhoben werden (Abbildung 19, Einfache Varianzanalyse,  $p = 0,0013$ ). So zeigte die PBS-Vergleichskohorte ausgehend von den WT-Mäusen eine signifikant ausgeprägtere Mikrogliaaktivität mit einer um fast +112% gesteigerten Mikrogliose ( $p < 0,01$ , Mittelwerte: WT = 99,46,  $\pm$  SEM 4,641; PBS = 211,3  $\pm$  SEM 35,45). Weiterhin ergab sich im Vergleich zur PBS-Kohorte eine signifikant verringerte Mikrogliose der mit NT4X-immunisierten Mäuse ( $p < 0,05$ , Mittelwert: NT4X = 136,0  $\pm$  SEM 10,22). Insgesamt konnte durch die Behandlung mit NT4X eine Abnahme der reaktiven Mikrogliose von rund -75% erreicht werden.

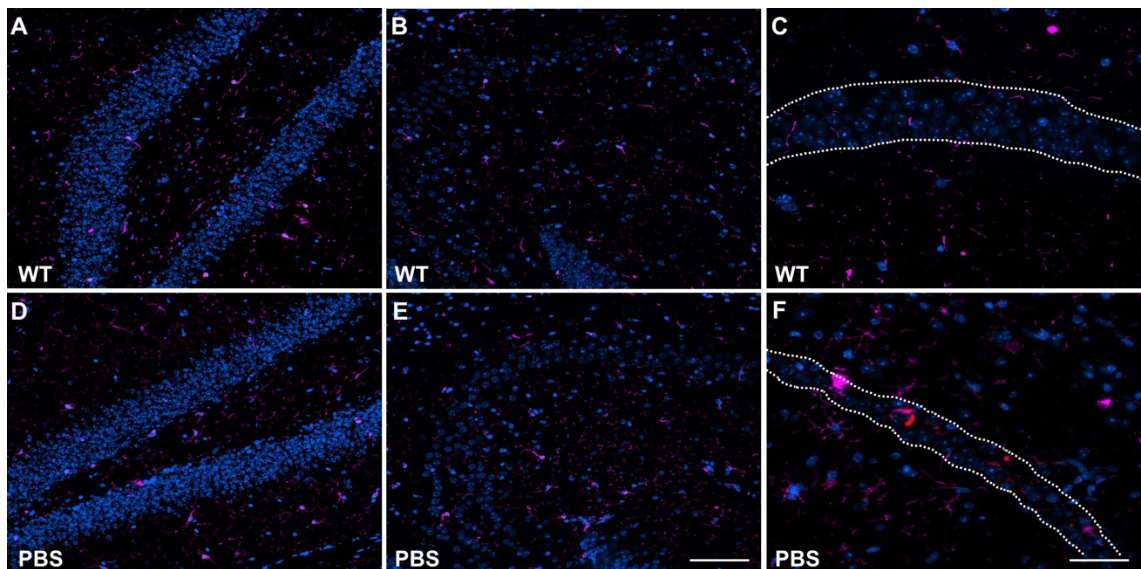


**Abbildung 19: Effekt der passiven Immunisierung mittels NT4X-Antikörper auf die Mikrogliose im Hippocampus.** Es zeigte sich bei den mit NT4X behandelten transgenen Mäusen eine deutliche Reduktion der reaktiven Mikrogliose im Hippocampusbereich um rund -75%. Für die durchgeführte Analyse wurden sämtliche Daten auf die Gruppe der WT-Tiere normalisiert. Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur.  $n = 9-10$  pro Gruppe (WT:  $n = 9$ , NT4X:  $n = 10$ , PBS:  $n = 9$ ). Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.



**Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der reaktiven Mikroglie.** Die Abbildung veranschaulicht die immunhistochemisch angefärbten Mikrogliazellen der betrachteten drei Vergleichskohorten jeweils in den unterschiedlichen Regionen des Hippocampus. Die Mikroglie ist besonders bei den betrachteten Gewebsschnitten des PBS-Tieres deutlich ausgeprägt (**rechte** Abbildungsspalte; **C, F, I** und **L**). Zwischen den dargestellten Gewebsschnitten des WT-Tieres (**linke** Abbildungsspalte; **A, D, G** und **J**) und des NT4X-immunisierten Tieres (**mittlere** Abbildungsspalte; **B, E, H** und **K**) lassen sich bildmorphologisch hingegen keine relevanten Unterschiede im Ausprägungsgrad der Mikrogliaaktivität feststellen. Antikörper: IBA-1 (1:1000). Maßstab: (A-C) = 200  $\mu\text{m}$ ; (D-L) = 100  $\mu\text{m}$ .



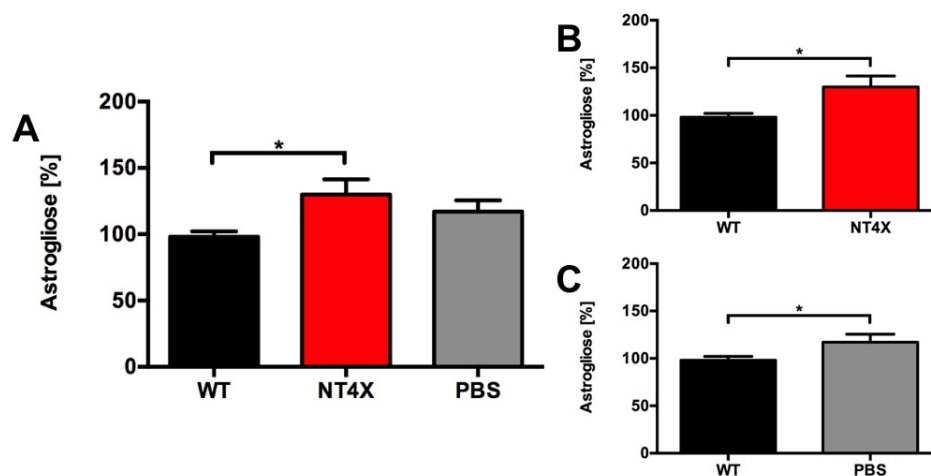


**Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung der Mikrogliaaktivität.** Exemplarisch werden in dieser Abbildung mittels Fluoreszenz-Immunhistochemie angefärbte Gewebeschnitte eines WT-Tieres (**oberer Bildabschnitt**) mit denen eines PBS-Tieres (**unterer Bildabschnitt**) verglichen. Es werden jeweils erneut sowohl der GD (**A, D**), ein Ausschnitt der CA2/3-Region (**B, E**) sowie die CA1-Region des Hippocampus (**C, F**) dargestellt. Zur Visualisierung der Mikrogliaaktivität wurden die Zellen mit dem primären Antikörper IBA-1 und einem entsprechenden sekundären Antikörper angefärbt, sodass sich bei einer Wellenlänge von 650 nm (**pink**) ein fluoreszierendes Signal ergab. Die A $\beta$ -Expression wurde durch den Einsatz des primären Antikörpers Solanezumab<sub>BS</sub> bei einer Wellenlänge von 594 nm (**rot**) veranschaulicht. Die Zellkerne der Neuronen erscheinen durch das verwendete Einschussmedium **blau**. Insgesamt zeigten die PBS-Tiere auch bildmorphologisch eine stärker ausgeprägte Mikrogliaaktivität, welche vor allem in der CA1-Region dargestellt werden konnte (**F**). Das Neuronenband der CA1-Region des Hippocampus erscheint im Vergleich zu den WT-Tieren (**C**) bei der PBS-Kohorte deutlich verschmälert und ausgedünnt. Darüberhinaus lassen sich in direkter Nähe zu dem vereinzelt exprimierten A $\beta$  kleine Ansammlungen von Mikrogliazellen erkennen (**F**). Antikörper: IBA-1 (1:500), Solanezumab<sub>BS</sub> (1:2500). Maßstab: (A,B,D,E) = 100  $\mu$ m; (C,F) = 50  $\mu$ m.

### 3.6.2 Analyse der Astrogliose

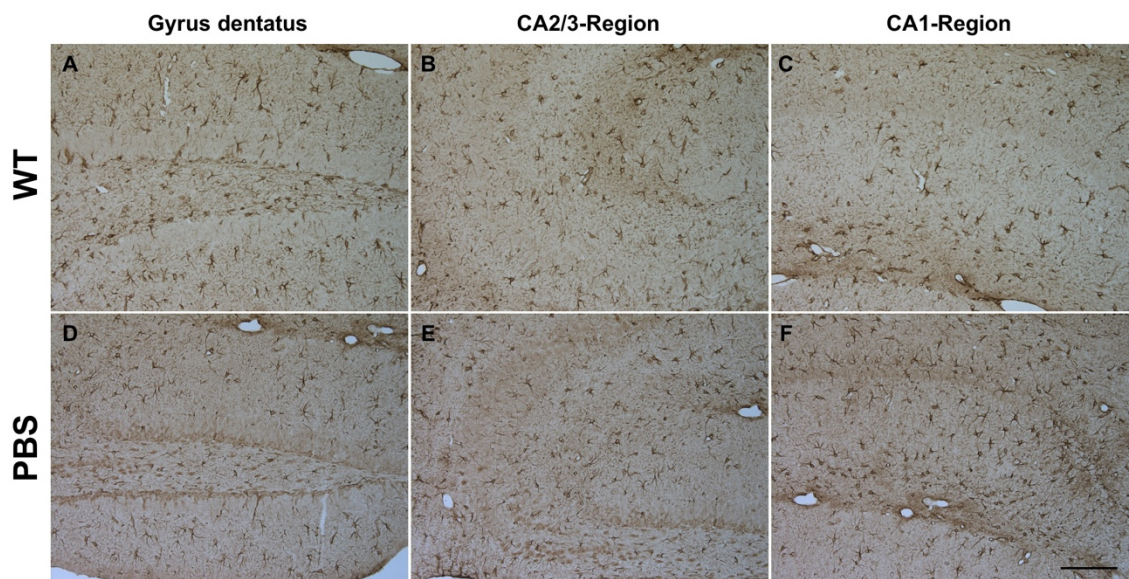
Die Grundlage für die Quantifizierung der Astrogliose bildete die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper GFAP (siehe Tabelle 4), der gegen das saure Gliafaserprotein gerichtet ist, welches als Bestandteil der Intermediärfilamente im Zytoplasma von Astrozyten vorkommt (Eng et al. 2000).

Die durchgeführte einfache Varianzanalyse zeigte sich insgesamt knapp statistisch signifikant (Abbildung 22A, Einfache Varianzanalyse,  $p = 0,0424$ ). Die Gruppe der NT4X-immunisierten Mäuse wies eine signifikant ausgeprägtere Astrogliaaktivität auf (rund +32%) als die WT-Kohorte ( $p < 0,05$ , Mittelwerte: WT =  $98,09 \pm \text{SEM } 3,966$ ; NT4X =  $129,9 \pm \text{SEM } 11,57$ ). Zwischen den beiden transgenen Tiergruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden werden (Mittelwert: PBS =  $117,1 \pm \text{SEM } 8,497$ ). Nachfolgende ungepaarte t-Tests bestätigten im Vergleich zu den WT-Mäusen jeweils die stärker ausgeprägte Astrogliose sowohl bei den NT4X-immunisierten Tieren (Abbildung 22B, ungepaarter t-Test,  $p = 0,0158$ ) als auch in der PBS-Vergleichsgruppe (Abbildung 22C, ungepaarter t-Test,  $p = 0,0475$ ). In einer zusätzlich durchgeführten t-Test-Analyse konnte zwischen der NT4X- und PBS-Kohorte kein statistisch signifikanter Unterschied und somit kein Behandlungseffekt erhoben werden (ungepaarter t-Test,  $p = 0,3865$ , hier jedoch nicht bildlich dargestellt).

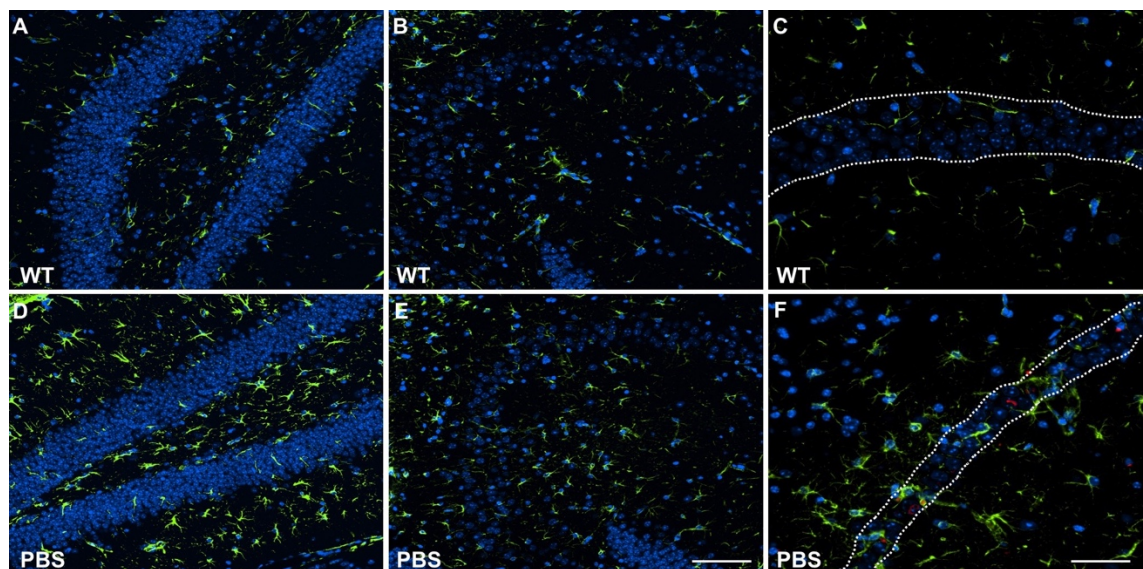


**Abbildung 22: Analyse der Astrogliose im Bereich des Hippocampus.** Die Abbildung **A** stellt das Ergebnis der durchgeführten einfachen Varianzanalyse graphisch dar. Die Kohorte der NT4X-immunisierten Mäuse zeigte in der Analyse eine statistisch signifikant um rund +32% ausgeprägtere Astrogliose als die WT-Tiere. Zwischen den transgenen NT4X- und PBS-Tieren konnte hierbei jedoch kein signifikanter Unterschied erhoben werden. In den Abbildungen **B** und **C** werden der WT-Kohorte jeweils die mittels ungepaartem t-Test erhobenen Ergebnisse für die transgenen Tiergruppen gegenübergestellt. Sowohl die mit NT4X behandelte Mausgruppe (**B**) als auch die Vergleichsgruppe aus PBS-Tieren (**C**) zeigte gegenüber den WT-Mäusen eine stärkere Ausprägung der Astrogliaaktivität. Für die durchgeführten Analysen wurden sämtliche Daten jeweils auf die Gruppe der WT-Tiere normalisiert. (**A**) Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. (**B**) und (**C**) jeweils ungepaarter t-Test.  $n = 9-10$  pro Gruppe (WT:  $n = 9$ , NT4X:  $n = 10$ , PBS:  $n = 9$ ). Daten jeweils dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM.





**Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der Astrogliose.** Die Abbildung verbildlicht exemplarisch die mittels DAB-Immunhistochemie angefärbten Astrogliazellen der WT- und PBS-Kohorte in den jeweils analysierten Regionen des Hippocampus. Im Bereich des GD (**A** und **D**) sowie der CA2/3-Region (**B** und **E**) lassen sich bildmorphologisch keine ausgeprägten Unterschiede in Bezug auf die Astrogliose ausmachen. Betrachtet man jedoch die Astrogliaaktivität in der CA1-Region des Hippocampus, so zeigen sich im Vergleich zum WT-Tier (**C**) deutlich mehr angefärbte Astrogliazellen im Gewebeschnitt des transgenen PBS-Tieres (**F**). Antikörper: GFAP (1:1000). Maßstab: (A-F) = 100  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung der Astrogliose.** In dieser Abbildung werden exemplarisch mithilfe von Fluoreszenz-Immunhistochemie angefärbte Gewebeschnitte eines WT-Tieres (**oberer Bildabschnitt**) mit denen eines PBS-Tieres (**unterer Bildabschnitt**) verglichen. Es werden hierbei jeweils erneut der GD (**A**, **D**), ein Ausschnitt der CA2/3-Region (**B**, **E**) sowie die CA1-Region des Hippocampus (**C**, **F**) dargestellt. Die Astrogliazellen wurden mit dem primären Antikörper GFAP und einem entsprechenden sekundären Antikörper angefärbt. Bei einer Wellenlänge von 488 nm (**grün**) ergab sich so ein fluoreszierendes Signal. Die A $\beta$ -Expression wurde abermals durch Einsatz des primären Antikörpers Solanezumab<sub>BS</sub> bei einer Wellenlänge

von 594 nm (**rot**) veranschaulicht. Die Nuclei der Nervenzellen erscheinen durch das verwendete Einschlußmedium **blau**. Bildmorphologisch kann in allen analysierten Arealen bei den PBS-Tieren (**D**, **E** und **F**) eine deutlich ausgeprägtere Aktivität der Astrogliazellen beobachtet werden, wohingegen diese bei den WT-Tieren (**A**, **B** und **C**) nur äußerst schwach darstellbar ist. Betrachtet man die CA1-Region des Hippocampus, so lässt sich im Gewebeschnitt des PBS-Tieres vereinzelt exprimiertes A $\beta$  darstellen, welches sowohl mit den Neuronen als auch mit den Astrogliazellen in topographischer Verbindung zu stehen scheint (**F**). Das CA1-Nervenzellband der transgenen PBS-Mäuse präsentiert sich erneut verschmälert und ausgedünnt (**F**). Antikörper: GFAP (1:1000), Solanezumab<sub>BS</sub> (1:2500). Maßstab: (A,B,D,E) = 100  $\mu$ m; (C,F) = 50  $\mu$ m.

## 4 Diskussion

Der Morbus Alzheimer ist eine chronische neurodegenerative Erkrankung, welche in ihrem Verlauf zahlreiche zerebrale histopathologische Veränderungen wie Amyloidablagerungen, NFT, neuroinflammatorische Prozesse sowie Neuronenverluste aufweist und zu progredienten kognitiven Einschränkungen des betroffenen Individuums führen kann. Als ein grundlegender Erklärungsansatz galt lange die von Hardy und Allsop im Jahre 1991 entwickelte Amyloidhypothese, wonach ein veränderter APP-Metabolismus zu einer konsekutiv gesteigerten Bildung von A $\beta$  führt, das sich folglich im Extrazellularraum ablagert (J Hardy und Allsop 1991). Eine spätere Weiterentwicklung dieses Konzepts stellt die modifizierte Amyloidhypothese dar (siehe Absatz 1.7.4), welche die bereits durch Masters et al. (1985a) vorgeschriebenen intraneuronalen A $\beta$ -Ablagerungen als einen zentralen Ausgangspunkt der Alzheimer-Pathogenese betrachtet (Wirhth et al. 2004). Insbesondere den zuvor weitestgehend unbeachteten löslichen Formen der A $\beta$ -Oligomere kommt hierbei eine Schlüsselrolle zu (Cline et al. 2018). Neben den A $\beta$ -Volllängenpeptiden existieren eine Vielzahl von N-trunkierten A $\beta$ -Varianten (siehe Absatz 1.7.5), die sich durch eine ausgeprägte Aggregationsneigung mit daraus resultierender erhöhter Stabilität sowie Toxizität auszeichnen (Masters et al. 1985b; Pike et al. 1995b). Nach Portelius et al. (2010) stellen A $\beta_{1-42}$ , A $\beta_{pE3-42}$ , A $\beta_{4-42}$  sowie A $\beta_{1-40}$  die hauptsächlich im Gehirn von AD-Patienten vorkommenden A $\beta$ -Varianten dar.

### 4.1 A $\beta$ -Expression im Bereich des Hippocampus bei jungen homozygoten Tg4-42-Mäusen

Um die neurotoxischen Effekte von N-trunkiertem A $\beta_{4-42}$  tiefgreifender analysieren zu können wurde die transgene Mauslinie Tg4-42 entwickelt, welche ausschließlich die A $\beta_{4-42}$ -Variante exprimiert (siehe Absatz 1.9). Die Tg4-42-Mauslinie kann im Gegensatz zu anderen transgenen Mausmodellen (Duyckaerts et al. 2008) wesentliche Elemente der AD-Pathologie ohne das Vorhandensein bekannter Mutationen in APP- oder PS-Genen abbilden, indem eine humane A $\beta_{4-42}$ -Sequenz mit dem murinen TRH-Signalpeptid fusioniert wurde und unter Kontrolle des neuronalen Thy-1 Promotors durch den entsprechenden Sekretionsweg geleitet wird (Y Bouter et al. 2013). Wenngleich das Tg4-42-Mausmodell im Stande ist einige charakteristische AD-Pathologien wie etwa signifikante Neuronenverluste in bestimmten Hirnregionen, inflammatorische Prozesse sowie Gedächtnisstörungen und Verhaltensauffälligkeiten zu reproduzieren, so fehlen hingegen beispielsweise extrazelluläre Amyloidplaques oder die Formation von NFT (Y Bouter et al. 2014).

Bislang konnte eine ausgeprägte intraneuronale A $\beta_{42}$ -Expression vor allem in der CA1-Region des Hippocampus bei dreimonatigen hemizygoten Tg4-42-Mäusen nachgewiesen werden, welche mit zunehmendem Alter der Tiere jedoch stark abnahm, was auf den ausgedehnten Nervenzellverlust in dieser Hirnregion zurückgeführt wurde (Y Bouter et al. 2013). Fer-



ner konnten Y Bouter et al. (2013) bei diesen Mäusen auch eine  $A\beta_{42}$ -Expression im okzipitalen Kortex, im piriformen Kortex, dem Striatum sowie im Bereich der Colliculi superiores bestätigen. Als Reaktion auf diese Ablagerungen konnte vor allem im Hippocampusbereich eine ausgeprägte Mikro- sowie Astrogliose quantifiziert werden, welche bereits bei zweimonatigen hemizygoten Tieren einsetzte (Y Bouter et al. 2013). Ein eindeutiger Nachweis von  $A\beta$ -Ablagerungen innerhalb von Neuronen des GD konnte bisweilen jedoch nicht in einem transgenen Mausmodell erfolgen (Wirhth 2017).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden junge, dreimonatige homozygote Tg4-42-Mäuse gezielt auf ihr  $A\beta_{42}$ -Expressionsmuster im Bereich des Hippocampus untersucht (siehe Absatz 3.2). Vor allem die CA1-Region wies in der immunhistochemischen Färbung eine deutliche Immunreaktivität gegenüber  $A\beta_{42}$  auf. Darüber hinaus konnte auch vereinzelt auftretendes intraneuronales  $A\beta$  im Bereich des GD sowie in der CA3-Region des Hippocampus nachgewiesen werden. Weitere Analysen zeigten neben einer  $A\beta_{42}$ -Expression im piriformen Kortex und Striatum auch  $A\beta$ -Ablagerungen im Subiculum, den Colliculi inferiores sowie den motorischen und sensorischen Kortexbereichen (C Bouter et al. 2018).

In der Vergangenheit wurden intraneuronale  $A\beta$ -Ablagerungen bereits in diversen transgenen AD-Mausmodellen wie beispielsweise der 3xTg-Mauslinie (Oddo et al. 2003), dem APP/PS1KI-Modell (Casas et al. 2004) oder auch in 5xFAD-Mäusen (Oakley et al. 2006) nachgewiesen. Diese intraneuronalen  $A\beta$ -Ablagerungen, denen eine wesentliche Rolle in der AD-Pathologie zugeschrieben wird (TA Bayer und Wirhth 2011), scheinen der Formation von NFT und extrazellulären Amyloidplaques voranzugehen (Fernandez-Vizarra et al. 2004; Wirhth et al. 2001). Ferner scheint das intrazelluläre  $A\beta$  in einem inversen Verhältnis zu den extrazellulären  $A\beta$ -Anteilen zu stehen, denn mit zunehmender Menge extrazellulärer Plaques sowie den damit verbundenen kognitiven Einschränkungen des Individuums konnte eine Abnahme des intrazellulären Anteils des  $A\beta$ -Peptids beobachtet werden (Gouras et al. 2000). Auch Oddo et al. (2006) konnten im 3xTg-Mausmodell mittels immuntherapeutischer Verfahren eine ähnliche dynamische Balance zwischen dem intraneuronalen sowie dem extrazellulären  $A\beta$ -Pool nachweisen. Diese Erkenntnisse stehen auch im Einklang mit der modifizierten Amyloidhypothese (Wirhth et al. 2004).

Insgesamt stützt der Nachweis von intraneuronalem  $A\beta$  im Bereich des GD sowie der CA3-Region des Hippocampus die weiteren im Rahmen dieser Forschungsarbeit erbrachten Ergebnisse eines signifikanten Nervenzellverlustes sowie einer deutlichen Zunahme inflammatorischer Prozesse bei homozygoten Tg4-42-Tieren in den  $A\beta$ -exprimierenden Bereichen. Allerdings nimmt die Dichte der intrazellulären  $A\beta$  enthaltenden Neurone auch mit fortschreitendem Alter des Individuums ab, während die kognitiven Einschränkungen weiter zunehmen, sodass intraneuronales  $A\beta$  nicht als alleiniger oder als der bedeutsamste Faktor der AD-Pathogenese angenommen werden sollte (Duyckaerts et al. 2008). Fraglich ist auch, warum in einer vorangegangenen Studie bei dreimonatigen hemizygoten Tg4-42-Mäusen un-

ter Verwendung des gleichen A $\beta_{42}$ -Antikörpers in diesen Arealen keine A $\beta$ -Expression nachgewiesen werden konnte (Y Bouter et al. 2013). Möglicherweise lässt sich dies auf den hemizygoten Genotyp der untersuchten Tiere und einer potenziell damit verbundenen geringer ausgeprägten A $\beta$ -Expression zurückführen. Ebenfalls könnte eine quantitativ geringe A $\beta$ -Belastung innerhalb des dichten Nervenzellverbandes des GD mittels des verwendeten immunhistochemischen Verfahrens nicht adäquat darzustellen sein.

## **4.2 Einfluss des NT4X-Antikörpers auf die Neuronenzahl und das Volumen des GD sowie der CA2/3-Region des Hippocampus von sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen**

Ausgeprägte Nervenzellverluste sowie eine progrediente zerebrale Atrophie gelten als wichtige neuropathologische Charakteristika des Morbus Alzheimer (Coleman und Flood 1987; Simic et al. 1997). Bereits Mitte der 1990er Jahre gelang mithilfe stereologischer Analysen eine Differenzierung zwischen gesunden und an AD erkrankten Individuen anhand der ermittelten Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus, wobei die AD-Erkrankten signifikant weniger Neurone in dieser Hirnregion aufwiesen (West et al. 1994).

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl transgener Mausmodelle entwickelt, welche zwar die wichtigsten neuropathologischen Kennzeichen der AD widerspiegeln, jedoch nur wenige dieser Modelle einen signifikanten Nervenzellverlust abbilden können (Wirhns und Zampar 2020). Das APP23-Modell (Sturchler-Pierrat et al. 1997) war eines der ersten transgenen Mausmodelle in dem Neuronenverluste vor allem in der CA1-Region beschrieben werden konnten (Calhoun et al. 1998). Auch bei APP/PS1KI-Mäusen konnte eine deutliche Reduktion der Neuronenzahl im Bereich des Frontalkortex sowie der CA1-Region festgestellt werden, welche auf eine ausgeprägte intraneuronale A $\beta$ -Belastung der jeweiligen Hirnregion zurückgeführt wurde (Casas et al. 2004; Christensen et al. 2010; Christensen et al. 2008). Ferner ließen sich auch im häufig betrachteten 5xFAD-Mausmodell Neuronenverluste in *Lamina V* des Kortex sowie im Subikulum nachweisen (Oakley et al. 2006). Auch in diesem Mausmodell konnten intraneuronale A $\beta$ -Ablagerungen, welche bei 5xFAD-Mäusen den extrazellulären Plaqueablagerungen vorausgehen, in den Hirnarealen mit relevanter Neurodegeneration bestätigt werden (Eimer und Vassar 2013; Jawhar et al. 2012). In der CA1-Region dieser Tiere zeigte sich kein signifikanter Nervenzellverlust, da intraneuronale A $\beta$ -Ablagerungen trotz einer vergleichbaren APP-Expression in diesem Hirnareal fehlten (Jawhar et al. 2012).

Bei dem im Rahmen dieser Forschungsarbeit betrachteten Tg4-42-Mausmodell konnte in vorangegangenen Analysen in der CA1-Region von achtmonatigen hemizygoten Tieren ebenfalls ein signifikanter Neuronenverlust von rund 38% im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren erhoben werden, der bei einer homozygoten Vergleichskohorte sogar 66% betrug (Y Bouter et al. 2013). Die daraus resultierenden Einschränkungen des Lernverhaltens sowie des räumlichen Gedächtnisses traten bei den hemizygoten Tieren ab einem Mausalter von

rund zwölf Monaten auf, während die homozygoten Tg4-42-Mäuse erste Einschränkungen bereits in einem Lebensalter von acht Monaten zeigten (Y Bouter et al. 2013). Insgesamt ließen sich auch hier die schweren Nervenzellverluste sowie Gedächtnisdefizite mit der oben genannten intraneuronalen A $\beta$ -Expression in diesem Areal korrelieren (Y Bouter et al. 2014). Nachfolgend soll der Einfluss der unter Absatz 4.1 diskutierten intraneuronalen A $\beta$ -Expression sowie einer passiven Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper auf die Neuronenzahl und das Volumen des GD sowie der CA2/3-Region des Hippocampus von sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen näher beleuchtet werden.

#### **4.2.1 NT4X kann den Nervenzellverlust bei homozygoten Tg4-42-Mäusen im GD signifikant reduzieren**

Neben der CA1-Region des Hippocampus konnten mittels stereologischer Quantifizierungen auch Nervenzellverluste im Bereich des GD anhand von humanen Gewebeschnitten von AD-Patienten erhoben werden, wenngleich sich diese jeweils in einem unterschiedlichen Ausmaß darstellten (Simic et al. 1997; West et al. 1994). Darüber hinaus bestätigten unter anderem auch Cotel et al. (2008) altersabhängige, signifikante Neuronenverluste im transgenen APP/PS1KI-Mausmodell bei zwölfmonatigen Mäusen in der Körnerzellschicht des GD, welche jedoch nicht auf eine detektierbare intraneuronale A $\beta$ -Expression in diesem Areal zurückgeführt werden konnten. Vorangehende stereologische Studien unserer Arbeitsgruppe am Tg4-42-Mausmodell zeigten eine signifikante Steigerung der Gesamtneuronenzahl im GD-Bereich, welche durch eine Exposition der transgenen Mäuse gegenüber einem Lebensumfeld mit vielfältigen stimulatorischen Reizen (*enriched environment*) sowie der Möglichkeit zur ausgeprägten physischen Aktivität erzielt werden konnte (Hüttenrauch et al. 2016). Ähnliche Ergebnisse konnten jedoch in einer anschließenden Studie, in welcher allein der Einfluss einer gesteigerten körperlichen Aktivität ohne weitere soziale oder umweltbezogene Stimulationen auf sechsmonatige homozygote Tg4-42-Mäuse untersucht wurde, nicht reproduziert werden (Gerberding et al. 2019). Weder die intermittierende noch die kontinuierliche körperliche Aktivität zeigte Auswirkungen auf die Gesamtneuronenzahl im Bereich des GD bei den WT- sowie transgenen Mäusen (Gerberding et al. 2019).

Antonios et al. (2015) wiesen mittels stereologischer Quantifizierungen bereits einen altersabhängigen Nervenzellverlust in der CA1-Region von homozygoten Tg4-42-Mäusen nach, welcher bereits ab einem Mausalter von vier Monaten einsetzte (Reduktion von 17%) und sich ab einem Lebensalter von rund fünf Monaten mit einem Neuronenverlust von 43% im Vergleich zu dreimonatigen WT-Mäusen als statistisch signifikant erwies. Erste Anzeichen eines beeinträchtigten räumlichen Gedächtnisses konnten bei diesen Tieren ab einem Alter von rund fünf Monaten beschrieben werden, welche sich bei sechs- und siebenmonatigen Tieren als deutlich ausgeprägt herausstellten (Antonios et al. 2015). Aufgrund dieser Ergebnisse wählten Antonios et al. (2015) ein Mausalter von drei Monaten als geeigneten Startpunkt für die Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper. Die homozygoten Tg4-42-Mäuse

erhielten folglich über einen Zeitraum von zwölf Wochen je eine wöchentliche intraperitoneale Injektion des monoklonalen NT4X-Antikörpers (Immunisierungsprotokoll siehe Absatz 2.1.5.2). Durch diesen präventiven Immunisierungsansatz konnte bei den mit NT4X behandelten Tg4-42-Mäusen der Neuronenverlust in der CA1-Region im Vergleich zu diversen gleichalten Kontrollgruppen (u.a. auch PBS-Tieren) signifikant vermindert und die oben beschriebenen Verhaltensdefizite deutlich abgeschwächt werden (Antonios et al. 2015).

Auch die im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit durchgeführten Analysen konnten bei dreimonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen noch keine Unterschiede hinsichtlich der Nervenzellzahl und des Volumens im Areal des GD im Vergleich zu einer gleichalten WT-Kohorte erheben (siehe Absatz 3.3). Basierend auf dieser Erkenntnis sowie den Ergebnissen von Antonios et al. (2015) sollte auch für die durchgeführten stereologischen Quantifizierungen im GD-Bereich von einem geeigneten präventiven Behandlungszeitpunkt auszugehen sein, um einen etwaigen Behandlungseffekt der NT4X-Immunisierung beurteilen zu können. Die Analyse der Gesamtneuronenzahl im Areal des GD ergab einen prozentualen Nervenzellverlust von ca. 14% bei den mit PBS behandelten sechsmonatigen homozygoten Tg-4-42-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten, gleichalten WT-Tieren. Die mit NT4X behandelten Tg4-42-Mäuse wiesen in der Quantifizierung rund 7% mehr Neurone im GD-Bereich auf als die PBS-Vergleichsgruppe, womit sich bezogen auf die Reduktion des Nervenzellverlustes ein signifikanter Behandlungseffekt der NT4X-Immunisierung ergab (siehe Absatz 3.4.1).

Um das therapeutische Potenzial einer passiven Immunisierung mit Anti-A $\beta$ -Antikörpern *in vivo* zu eruieren wurde in diversen präklinischen Studien eine Verminderung der zerebralen Amyloidplaque-Belastung in transgenen AD-Mausmodellen quantifiziert und ein Therapieerfolg anhand dessen bemessen (Bard et al. 2000; Demattos et al. 2012; Frost et al. 2012). Jedoch ist weithin bekannt, dass der Ausprägungsgrad der A $\beta$ -Ablagerungen nicht unbedingt mit den kognitiven Einschränkungen eines Individuums in Korrelation steht (Ricciarelli und Fedele 2017; Walsh und Selkoe 2007), sodass in den Analysen der vorliegenden Forschungsarbeit die Reduktion des Neuronenverlustes als Kriterium zur Validierung des therapeutischen Effektes der NT4X-Immunisierung betrachtet wurde.

Die erhobenen Ergebnisse stehen in nachvollziehbarem Einklang mit dem Nachweis der in Absatz 3.2 beschriebenen intraneuronalen A $\beta$ -Expression im GD-Bereich. Beide betrachteten transgenen Mausgruppen wiesen verglichen mit den WT-Tieren einen signifikanten Nervenzellverlust im GD-Bereich auf, welcher am ehesten auf eine A $\beta$ -induzierte Neurodegeneration zurückgeführt werden kann. Es ist anzunehmen, dass der verwendete NT4X-Antikörper über eine Reduktion dieser A $\beta$ -Belastung wirkt, da der Antikörper unter anderem gezielt gegen A $\beta_{442}$  gerichtet ist und diese A $\beta$ -Variante selektiv im Tg4-42-Mausmodell exprimiert wird. Ebenfalls wäre auch der Einfluss über eine Modulation neuroinflammatorischer Prozesse, wie beispielsweise über eine durch NT4X-Immunisierung herunterregulierte Mikrogliaaktivität (siehe dazu Absatz 3.6.1), und eine potenziell damit im Zusammenhang

stehende abgeschwächte Neurodegeneration denkbar. Auf die in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur diskutierten Wirkmechanismen von Immunisierungstherapien soll unter Absatz 4.3 nachfolgend gesondert eingegangen werden. Insgesamt zeigen die erhobenen Ergebnisse, dass sich der durch Antonios et al. (2015) für die CA1-Region beschriebene positive therapeutische Effekt der NT4X-Immunisierung auch auf den GD-Bereich übertragen lässt.

#### **4.2.2 Homozygote Tg4-42-Mäuse weisen im Vergleich zu WT-Tieren eine reduzierte Neuronenzahl in der CA2/3-Region des Hippocampus auf**

Neben dem GD sowie der CA1-Region bildet auch die nachfolgend betrachtete CA2/3-Region einen Teil der bei Lern- sowie Gedächtnisprozessen maßgeblich beteiligten Hippocampusformation, welche die relevanten Informationen mittels Neurotransmission vom EK erhält. Die Körnerzellen des GD projizieren über Moosfasern in die CA3-Region, von der wiederum Pyramidenzellen zu kollateralisierenden Axonen in die CA1-Region ziehen, welche unidirektional zurück zum Kortex projiziert (Amaral und Witter 1989; Avshalumov und Mandyam 2021). Der CA2-Region, die sich zwischen der CA1- und CA3-Region befindet, wurde bisweilen keine eindeutige Funktion zugewiesen, allerdings deuten neuere Studien auf einen viel größeren Beitrag zur hippocampalen Informationsverarbeitung hin als initial vermutet wurde (Middleton und McHugh 2020). Im Rahmen der durchgeführten stereologischen Analysen dieser Forschungsarbeit wurde die CA2/3-Region jedoch aufgrund ihrer schweren Abgrenzbarkeit als zusammenhängendes Areal betrachtet (siehe Abbildung 4).

Frühe stereologische Quantifizierungen durch West et al. (1994) konnten einen Neuronenverlust in der CA2/3-Region von AD-Patienten nachweisen, wenngleich sich dieser gegenüber einer gleichaltrigen Kontrollgruppe als nicht statistisch signifikant herausstellte und in einer späteren Studie dieser Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden konnte (West et al. 2004). Darüber hinaus berichteten Padurariu et al. (2012) anhand von humanen Gewebeschnitten über eine Abnahme der Nervenzellichte in der CA3-Region des Hippocampus bei AD-Patienten.

Auch die sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäuse wiesen in den durchgeführten stereologischen Quantifizierungen der vorliegenden Forschungsarbeit in ungepaarten t-Tests jeweils signifikante Nervenzellverluste gegenüber einer gleichalten Kohorte aus unbehandelten WT-Tieren auf (siehe Absatz 3.4.2). Die Neuronenzahl zeigte sich ausgehend von den WT-Mäusen bei der PBS-Kontrollgruppe im Mittel um fast 22% reduziert. Bei den mit dem NT4X-Antikörper behandelten Tieren betrug dieser Nervenzellverlust sogar rund 26%. Zwischen den beiden transgenen Mausgruppen konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied in der Neuronenzahl erhoben werden. Somit zeigte sich in dieser Analyse kein signifikanter Einfluss der NT4X-Immunisierung auf die Nervenzellzahl der CA2/3-Region.

Ausgeprägte Neuronenverluste in der CA3-Region konnten bereits bei APP<sub>E693Δ</sub>-Tg-Mäusen beschrieben werden, welche eine altersabhängige Akkumulation von intraneuronalen Aβ-Oligomeren in diesem Bereich aufwiesen, ohne jedoch extrazelluläre Aβ-Ablagerungen zu

entwickeln (Tomiyama et al. 2010). Zeitgleich mit dem Nachweis der intraneuronalen A $\beta$ -Ablagerungen zeigten die APP<sub>E693 $\Delta$</sub> -Tg-Mäuse ab einem Alter von rund acht Monaten eine signifikante Abnahme des präsynaptischen Markers Synaptophysin, der wiederum zeitlich im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität sowie der Gedächtnisleistung der betrachteten Tiere zu stehen schien (Tomiyama et al. 2010). Auch im Tg4-42-Mausmodell konnte bereits mittels Synaptophysin-Färbung ein verändertes synaptisches Muster in der CA3-Region nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Störung innerhalb des Neuronennetzwerkes hindeuten könnte und bei den homozygoten Tieren deutlich stärker ausgeprägt war (Y Bouter et al. 2013).

Ferner konnte auch in der CA2/3-Region der Tg4-42-Mäuse eine, wenngleich geringe, intraneuronale A $\beta$ -Expression bestätigt werden (siehe Absatz 3.2), welche zu einer A $\beta$ -induzierten Neurodegeneration führen, und so die beschriebenen Neuronenverluste in diesem Areal bei den transgenen Tieren auslösen kann. Da der NT4X-Antikörper unter anderem gezielt gegen die im Tg4-42-Mausmodell exprimierte A $\beta$ <sub>4-42</sub>-Variante gerichtet ist, deren Expression in der CA2/3-Region verglichen mit der CA1-Region nur relativ gering ist, könnten sich damit im Verhältnis zur quantifizierten Fläche des CA2/3-Areals auch nur wenige Angriffspunkte für eine Anti-A $\beta$ -Antikörpertherapie bieten. Dies könnte als ein möglicher Erklärungsansatz für einen ausbleibenden Behandlungseffekt der NT4X-Immunsierungstherapie für dieses Areal betrachtet werden. Neben dem Einfluss der A $\beta$ -Belastung könnte in diesem Zusammenhang auch eine Aktivierung bzw. Modulierung inflammatorischer Prozesse eine Rolle spielen, auf die nachfolgend näher eingegangen wird (siehe Absatz 4.5). Insgesamt könnten weitere Quantifizierungen der Neuronenzahlen im CA2/3-Areal zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Altersverlauf der betrachteten Tg4-42-Mäuse zur Charakterisierung der Neurodegeneration in diesem Bereich beitragen, um den genauen Alterszeitpunkt des Beginns der Nervenzellverluste zu identifizieren. Gegebenenfalls könnte durch einen früheren Beginn der Immuntherapie ein Behandlungseffekt erzielt werden.

#### **4.2.3 Sechsmonatige homozygote Tg4-42-Mäuse zeigen eine signifikante Volumenreduktion im Bereich des GD**

Neben den geschilderten Neuronenverlusten konnte bei AD-Patienten auch eine ausgeprägte zerebrale Atrophie beobachtet werden, die im Krankheitsverlauf vor allem den medialen Temporallappen, den Hippocampusbereich, die Amygdala sowie den EK betrifft (Bottino et al. 2002). Als kausale Faktoren dieser Gehirnatrophie werden sowohl NFT-Ablagerungen (Serrano-Pozo et al. 2011a) als auch die intrazelluläre A $\beta$ -Belastung (TA Bayer und Wirths 2010) diskutiert, welche zu immensen Neuronenverlusten führen können. Allerdings könnten auch ausgeprägte Synapsenverluste, welche in der AD-Pathogenese zeitlich noch vor den Nervenzellverlusten auftreten, einen weiteren Einflussfaktor darstellen (Serrano-Pozo et al. 2011a). Auch anhand von volumetrischen Quantifizierungen mittels des Cavalieri-Prinzips konnte eine deutliche Volumenreduktion der gesamten Hippocampusformation bei AD-Patienten nachgewiesen werden (Simic et al. 1997).

Ebenfalls wurden bereits in diversen transgenen AD-Mausmodellen Volumenänderungen in Bereichen der Hippocampusformation beschrieben, wenngleich mit teils widersprüchlichen Ergebnissen. So konnte beispielsweise bei sechsmonatigen APP/PS1KI-Mäusen im Vergleich zur gleichalten PS1KI-Kontrollgruppe eine Volumenreduktion der Pyramidenzellschicht der CA1-Region von rund 30% erhoben werden, welche mit einem signifikanten Nervenzellverlust in diesem Areal assoziiert war (Breyhan et al. 2009). Trotz deutlicher Neuronenverluste im GD-Bereich zeigten sich jedoch bei zwölfmonatigen APP/PS1KI-Tieren keine Volumenunterschiede im Areal des GD (Cotel et al. 2008). Im PDAPP-Mausmodell konnte durch volumetrische Quantifizierungen mittels des Cavalieri-Prinzips bei 100 Tage alten PDAPP-Tieren im Vergleich zu gleichalten WT-Mäusen eine Reduktion des GD-Volumens um ca. 28% festgestellt werden, wohingegen andere hippocampale Bereiche wie CA1- sowie CA3-Region oder das Subiculum keine signifikanten Volumenänderungen aufwiesen (Redwine et al. 2003). Für homozygote Tg4-42-Mäuse konnte in der Vergangenheit bereits eine signifikante Reduktion des Volumens der CA1-Region beschrieben werden, welche sich ebenfalls mit einem deutlichen Verlust an Nervenzellen in diesem Areal assoziierbar zeigte (C Bouter et al. 2018; Sichler et al. 2019).

Im Rahmen der durchgeführten volumetrischen Analysen dieser Forschungsarbeit konnte eine eindeutige Volumenreduktion bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen im GD-Bereich belegt werden (siehe Absatz 3.4.1). So wiesen die mit NT4X immunisierten Tiere im Verhältnis zu gleichalten WT-Mäusen eine relative Volumenreduktion von fast 13% auf, wohingegen die mit PBS behandelten Mäuse sogar einen Volumenverlust von rund 19,5% in diesem Areal aufwiesen. Zwischen den beiden transgenen Kohorten konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede des Volumens und damit kein signifikanter Behandlungseffekt der NT4X-Immunsierung erhoben werden. Für die CA2/3-Region ließen sich in der durchgeführten einfachen Varianzanalyse keine statistisch signifikanten Volumenunterschiede zwischen den betrachteten Mausgruppen ermitteln, wenngleich sich in einem nachfolgend durchgeführten ungepaarten t-Test eine signifikante Volumenreduktion der mit NT4X-immunisierten Mäuse verglichen mit den WT-Tieren zeigte (siehe Absatz 3.4.2).

Diese Ergebnisse stützen grundsätzlich die Assoziation von Volumenreduktionen in Hirnarealen mit ausgeprägten Nervenzellverlusten, denn auch im GD- sowie CA2/3-Bereich konnten signifikante Neuronenverluste bei den transgenen Tg4-42-Mausgruppen beschrieben werden (siehe dazu Absatz 3.4.1 sowie Absatz 3.4.2). Da das Tg4-42-Modell keine NFT-Ablagerungen und keine extrazellulären A $\beta$ -Plaques aufweist (Y Bouter et al. 2013), können diese hingegen nicht als kausaler Erklärungsansatz für die Gehirnatrophie angenommen werden. Vielmehr scheint die durch intraneuronale A $\beta$ -Ablagerungen hervorgerufene Neurodegeneration ein Hauptauslöser der Volumenverluste bei den Tg4-42-Mäusen zu sein. Dennoch könnten sich zusätzlich auch andere Faktoren, wie z.B. Synapsenverluste in den betreffenden Hirnarealen, auf die Gehirnatrophie auswirken. Auch wenn durch die NT4X-Immunsierung der Nervenzellverlust im GD-Bereich der Tg4-42-Mäuse signifikant abgeschwächt

werden konnte, zeigten sich in diesem Hirnareal zwischen den beiden transgenen Tiergruppen keine statistisch signifikanten Volumendifferenzen. Der Behandlungseffekt von NT4X auf die Neuronenzahl im GD könnte sich aufgrund der geringen quantitativen Ausprägung nicht als statistisch signifikante Volumendifferenz abbilden, wenngleich für das GD-Areal dieser Tiere unter dem Einfluss der Immunisierungstherapie ein gewisser statistischer Trend für einen geringeren Volumenverlust besteht (siehe Abbildung 12B). Schlussendlich wäre es spannend, ob sich die präventive NT4X-Immunisierung nachhaltig auf das Volumen im weiteren Altersverlauf der betrachteten Tg4-42-Tiere auswirken kann – eine grundsätzliche progrediente Gehirnatrophie in den betrachteten Hirnarealen vorausgesetzt.

### 4.3 Therapieansatz der passiven Immunisierung mit dem monoklonalen NT4X-Antikörper

Bereits vor über 20 Jahren leisteten Schenk et al. (1999) mit ihren Experimenten zur aktiven A $\beta$ -Immunisierung Pionierarbeit auf dem Gebiet der Immunisierungstherapien als möglichen kausalen Behandlungsansatz des Morbus Alzheimer (TA Bayer und Wirths 2014). Insbesondere dem Konzept der passiven Immunisierung wird mit der Entwicklung und Erprobung von zahlreichen Antikörpern gegen unterschiedliche A $\beta$ -Epitope (siehe Absatz 1.10.2) besondere Aufmerksamkeit entgegengebracht. Die genauen Wirkmechanismen der Immunisierungstherapien sind auch gegenwärtig weitestgehend unklar und Gegenstand aktueller Forschung (Mantile und Prisco 2020; Zampar und Wirths 2020). Nachfolgend sollen einige dieser möglichen allgemeinen Wirkungsweisen diskutiert werden.

Als ein potenzieller Wirkmechanismus wird beispielsweise ein katalytischer Effekt der Antikörper vermutet (TA Bayer und Wirths 2014), welche durch direkte Antikörperbindung A $\beta$ -Aggregate spalten und das Gleichgewicht zwischen aggregierten A $\beta$ -Formen und monomeren A $\beta$  zugunsten der leichter abzubauenen monomeren A $\beta$ -Formen verschieben können (Brody und Holtzman 2008). Bereits früh konnte durch *in vitro*-Analysen nachgewiesen werden, dass Anti-A $\beta$ -Antikörper sowohl eine Aggregation von A $\beta$ -Fibrillen verhindern (Solomon et al. 1996), als auch deren Aggregation rückgängig machen und die damit verbundene Neurotoxizität vermindern können (Solomon et al. 1997). Aus einer gegen die A $\beta$ -Aggregate gerichteten Therapie, welche diese in lösliche A $\beta$ -Formen überführt, könnten jedoch auch toxische Wirkungen resultieren, denn insbesondere lösliche A $\beta$ -Oligomere führen nach neueren Erkenntnissen zur Neurodegeneration (Benilova et al. 2012; Cline et al. 2018), wohingegen den A $\beta$ -Plaques der modifizierte Amyloidhypothese zufolge eher eine Reservoirfunktion zukommt (Wirths et al. 2004). Jedoch kann in Anbetracht der anhand der Tg4-42-Mauslinie durchgeführten Analysen dieser Wirkmechanismus für den NT4X-Antikörper weitestgehend ausgeschlossen werden, da in diesem Mausmodell keine Amyloidplaques ausgebildet werden (Y Bouter et al. 2013).

Ein weiterer diskutierter Mechanismus stellt eine durch Anti-A $\beta$ -Antikörper ausgelöste und Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose von A $\beta$ -Ablagerungen durch Mikrogliazellen dar (Bard



et al. 2003; Bard et al. 2000). In weiterführenden Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Phagozytose auch unabhängig vom Fc-Rezeptor erfolgen kann (Bacskaï et al. 2002; Das et al. 2003). So demonstrierten beispielsweise Das et al. (2003) anhand von Fc-Rezeptor-Knockout-Mäusen der Tg2576-Mauslinie, dass die intrazerebralen A $\beta$ -Ablagerungen dieser Tiere durch die passive Immunisierung auf vergleichbare Werte einer Tg2576-Kontrollgruppe gesenkt werden konnten. Auch in Versuchsreihen mit dem NT4X-Antikörper konnte durch eine Immunisierung mit einem entsprechenden Fab-Fragment des NT4X-Antikörpers bei Tg4-42-Mäusen der Neuronenverlust reduziert und das Lernverhalten verbessert werden (Antonios et al. 2015). Damit scheint auch die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose durch Mikrogliazellen nicht als Wirkmechanismus des NT4X-Antikörpers in Frage zu kommen.

Durch einige Autoren wurde in der Vergangenheit die *Peripheral Sink*-Hypothese propagiert, wonach sich die löslichen A $\beta$ -Spiegel im Gehirn sowie im peripheren Blut in einem Gleichgewicht befinden und eine Bindung oder der Abbau des A $\beta$  im Blutkreislauf den Ausfluss des A $\beta$  aus dem Gehirn erhöht und sich damit die A $\beta$ -Belastung des Gehirns verringert (Mantile und Prisco 2020). Demnach könnten applizierte A $\beta$ -Antikörper als eine Art peripherer A $\beta$ -„Sink“ fungieren, wodurch ein Konzentrationsgradient erzeugt wird, der monomeres A $\beta$  über passive Diffusionsmechanismen aus dem ZNS ziehen kann (Zampar und Wirths 2020). So konnte im transgenen PDAPP-Mausmodell durch eine passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper m266, der gegen das zentrale A $\beta$ -Epitop gerichtet ist und eine hohe Affinität zu löslichen A $\beta$ -Peptiden besitzt, ein Anstieg des A $\beta$ -Plasmaspiegels sowie eine Reduktion der A $\beta$ -Ablagerungen im Gehirn beobachtet werden, obwohl m266 kein aggregiertes A $\beta$  bindet (DeMattos et al. 2001). Weiterführende Versuchsreihen berichteten sogar über eine akute Verbesserung der Lern- und Gedächtnisfunktionen immunisierter PDAPP-Tiere, welche jedoch ohne wesentliche Veränderungen der A $\beta$ -Belastung des Gehirns auftraten und von den Autoren auf eine erhöhte periphere *Clearance* und/oder Sequestrierung löslicher A $\beta$ -Spezies zurückgeführt wurde (Dodart et al. 2002). Yamada et al. (2009) konnten hingegen nachweisen, dass der peripher applizierte monoklonale Antikörper m266 innerhalb des ZNS an lösliche, monomere A $\beta$ -Formen bindet und diese stabilisiert, wodurch eine intrazerebrale A $\beta$ -Aggregation verhindert und die damit verbundene erhöhte Neurotoxizität neutralisiert wird. Auch transgene APP23-Mäuse, denen die A $\beta$ -abbauende Metalloprotease NEP intravenös appliziert wurde, zeigten trotz konsekutiv reduzierten A $\beta$ -Plasmaspiegeln keine Abnahme der zerebralen Amyloidbelastung (Walker et al. 2013). Eine ähnliche Studie an Tg2576-Mäusen, Ratten und Affen bestätigte die unveränderten A $\beta$ -Spiegel im Gehirn sowie im Liquor bei peripherer Applikation von NEP (Henderson et al. 2014). Insgesamt lässt sich also der *Peripheral Sink*-Mechanismus als Erklärungsansatz für die Wirkungsweise des untersuchten NT4X-Antikörpers eher nicht annehmen.

Eine weitere Theorie zu Wirkungsmechanismen legt den Fokus auf lösliche A $\beta$ -Oligomere als direkten Angriffspunkt der Antikörpertherapie, welche als potenzieller Hauptauslöser der AD-Erkrankung diskutiert werden (Verma et al. 2015). Zudem scheint die Menge an löslichen A $\beta$ -Oligomeren im Vergleich zu den häufiger untersuchten Amyloid-Plaques besser

mit der eigentlichen Erkrankungsschwere zu korrelieren (DaRocha-Souto et al. 2011), weshalb diese ein vielversprechendes Ziel neuerer Therapieansätze darstellen könnten (Hefti et al. 2013). Verschiedene Studien zeigten bereits, dass die hippocampale Langzeitpotenzierung vor allem durch lösliche A $\beta$ -Oligomere inhibiert werden kann (Townsend et al. 2006; Walsh et al. 2002; HW Wang et al. 2002). Klyubin et al. (2005) konnten eine durch intrazerebroventrikuläre Injektion von menschlichen A $\beta$ -Oligomeren in den Hippocampus von Ratten hervorgerufene Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung durch die sofortige Gabe eines monoklonalen A $\beta$ -Antikörpers weitestgehend verhindern. Ferner zeigte die passive Immunisierung von transgenen Tg2576-Mäusen mit dem monoklonalen Antikörper NAB61, welcher ein für oligomere A $\beta$ -Formen spezifisches Konformationsepitop erkennt und bindet, in Versuchsreihen eine signifikante Verbesserung des räumlichen Lernens sowie der Gedächtnisfunktion (EB Lee et al. 2006). Auch für den NT4X-Antikörper wäre dieses Wirkprinzip über eine direkte Bindung der A $\beta$ -Oligomere mit konsekutiver Neutralisierung ihrer toxischen Effekte denkbar. Der monoklonale NT4X-Antikörper bindet die oligomeren, N-trunkierten A $\beta$ -Formen A $\beta_{4-42}$  sowie A $\beta_{pE3-42}$  (Antonios et al. 2015; Antonios et al. 2013; TA Bayer 2021). Passend zu diesem Bindungsprofil konnte NT4X in neuronalen Zellkulturen die durch A $\beta_{4-42}$  sowie A $\beta_{pE3-42}$  induzierte Toxizität inhibieren ohne jedoch Einfluss auf die durch das Volllängenpeptid A $\beta_{1-42}$  vermittelte Toxizität zu nehmen (Antonios et al. 2015). Darüber hinaus verhinderte die passive Immunisierung mit NT4X bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen das Auftreten wesentlicher Einschränkungen im räumlichen Gedächtnis sowie einen signifikanten Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus (Antonios et al. 2015). Zudem konnte im Rahmen dieses Dissertationsvorhabens durch die Behandlung mit NT4X ebenfalls eine signifikante Eindämmung der Neuronenverluste im Bereich des GD bei den transgenen Mäusen beschrieben werden. Eine wesentliche Grundvoraussetzung für das angenommene Wirkungsprinzip bildet jedoch die Penetration des NT4X-Antikörpers durch die BHS, um vom peripheren Applikationsort an den zerebralen Wirkungsort zu gelangen.

#### **4.4 Auswirkungen der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X auf die Neurogenese im Tg4-42-Mausmodell**

Bei adulten Individuen konnte die Neurogenese im ZNS vor allem in der SVZ des lateralen Ventrikels sowie in der SGZ des GD lokalisiert werden (LC Abbott und Nigussie 2020). Sie ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, der sich aus verschiedenen Phasen zusammensetzt und maßgeblich zur neuronalen Plastizität beiträgt, indem sie bei vielen Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt ist (Kempermann et al. 2015). Demzufolge können Einschränkungen in diesen Prozessen, wie sie etwa auch bei der fortgeschrittenen AD vorkommen, zumindest ansatzweise auf eine eingeschränkte Neurogenese zurückgeführt werden (Hollands et al. 2016). Um den eigentlichen Prozess sowie etwaige Veränderungen der Neurogenese immunhistochemisch darzustellen, erfolgt häufig neben weiteren möglichen Nachweismethoden

eine Antikörperfärbung gegen DCX, welches als Mikrotubuli-assoziiertes Protein spezifisch in nahezu allen migrierenden neuronalen Vorläuferzellen exprimiert wird (Couillard-Despres et al. 2005) und sich in der Vergangenheit als ein valider Parameter zur Quantifizierung der Neurogenese etabliert hat.

Es ist bereits lange bekannt, dass eine gesteigerte körperliche Aktivität sowie eine Umgebung mit vielfältigen stimulatorischen Reizen einen positiven Einfluss auf die Neubildung von Neuronen und die damit verbundene allgemeine kognitive *Performance* eines Individuums hat (Hüttenrauch et al. 2016; van Praag et al. 1999; van Praag et al. 2005). Demgegenüber haben beispielsweise Stress, der natürliche Alterungsprozess und die progrediente Neurodegeneration einen negativen Einfluss auf die adulte Neurogenese (Gould und Tanapat 1999; HG Kuhn et al. 1996).

Bezüglich der adulten Neurogenese im humanen Organismus gibt es nur wenige, zum Teil auch widersprüchliche Studien (Winner und Winkler 2015). So konstatiert beispielsweise eine neuere wissenschaftliche Arbeit, dass die humane hippocampale Neurogenese im Altersverlauf auf nahezu nicht nachweisbare Werte abfällt (Sorrells et al. 2018), wohingegen andere Autoren eine bis ins hohe Lebensalter anhaltende kontinuierliche Neubildung von Neuronen proklamieren (Spalding et al. 2013). Bei AD-Erkrankten konnte jedoch im Vergleich zu gesunden Individuen eine stark progrediente Abnahme der adulten Neurogenese beobachtet werden (Moreno-Jimenez et al. 2019).

Insbesondere den verschiedenen transgenen Mausmodellen kommt so bei der Betrachtung und Analyse der Neurogenese im Rahmen der AD-Pathologie eine bedeutsame Rolle zu (Wirths 2017). In diversen transgenen AD-Mausmodellen konnten Veränderungen der Neurogeneserate beschrieben werden, wobei die Mehrzahl der Analysen eine reduzierte Neurogeneserate ergab und nur wenige Tiermodelle eine gesteigerte Neurogeneserate zeigten (Babcock et al. 2021; Lazarov und Marr 2010; Marlatt und Lucassen 2010). Generell scheint jedoch in den meisten Studien eine vermehrte altersabhängige Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden in einem engeren Zusammenhang mit einer Abnahme der Neurogeneserate zu stehen (Wirths 2017), wobei einzuwenden ist, dass Nagetiere grundsätzlich einer altersabhängigen Reduktion der Neurogeneserate zu unterliegen scheinen (HG Kuhn et al. 1996). So konnte im 3xTg-Mausmodell, welches Mutationen in PS-1, APP sowie Tau aufweist (Oddo et al. 2003), bei weiblichen viermonatigen Tieren eine signifikant verminderte Neurogeneserate nachgewiesen werden, welche maßgeblich auf die zunehmenden intraneuronalen A $\beta$ -Ablagerungen in der CA1-Region des Hippocampus zurückgeführt wurde, denn eine signifikante extrazelluläre A $\beta$ -Plauepathologie setzte bei diesen Mäusen erst ab einem Alter von rund zwölf Monaten ein (Rodriguez et al. 2008). Auch im APP/PS1KI-Mausmodell, das auf einer PS-1-Mutation mit Überexpression eines mutierten humanen APP basiert (Casas et al. 2004), zeigte sich eine mit intraneuronalen A $\beta$ -Akkumulationen assoziierbare Reduktion der Neurogeneserate (Cotel et al. 2012; Faure et al. 2011). Diese intrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen

konnten hierbei bislang jedoch nur in der CA1-Region und nicht im Bereich des GD immunhistochemisch nachgewiesen werden (Cotel et al. 2008). Gegensätzlich dazu berichtet eine andere Studie über eine gesteigerte hippocampale Neurogenese in AD-Patienten, welche sich in einer hochregulierten Expression neuronaler Markerproteine (unter anderem auch DCX) in der SGZ des GD sowie der CA1-Region äußerte (K Jin et al. 2004b). Diese Studienergebnisse konnten im transgenen PDGF-APP<sub>sw,Ind</sub>-Mausmodell, das zwei APP-Mutationen aufweist, reproduziert werden, sodass hierbei ein möglicher Einfluss klinischer Störvariablen weitestgehend ausgeschlossen werden sollte (K Jin et al. 2004a). K Jin et al. (2004a) sahen in dieser erhöhten Neurogeneserate einen Kompensationsmechanismus, um die im Rahmen der AD-Pathogenese degenerierten Nervenzellen zu ersetzen.

Ferner wird dem A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Peptid in der Literatur sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein neurogener Effekt zugeschrieben, der die Neurogenese in der SVZ über den p75-Neurotrophin-Rezeptor stimulieren kann (Sotthibundhu et al. 2009). Ältere Studien zeigten bereits eine durch A $\beta$ <sub>42</sub>-Oligomere induzierte Erhöhung der Neurogenese (Lopez-Toledano und Shelanski 2004), welche später auch *in vivo* am PDGF-APP<sub>sw,Ind</sub>-Mausmodell nachvollzogen werden konnte (Lopez-Toledano und Shelanski 2007). Nach Lopez-Toledano und Shelanski (2007) sei dieser Effekt jedoch insbesondere vom Aggregationsstatus der A $\beta$ -Peptide abhängig und nur durch die oligomeren A $\beta$ -Formen bedingt.

Auch neuroinflammatorische Prozesse, die im Rahmen der AD-Erkrankung charakteristischerweise auftreten, können die Neurogenese durch verschiedene Entzündungskomponenten wie Immunzellen, Zytokine oder Chemokine beeinflussen und das Überleben, die Proliferation und die Reifung neuronaler Stammzellen beeinflussen (Sung et al. 2020). Beispielsweise werden für Mikrogliazellen in diversen Studien sowohl proneurogene als auch antineurogene Effekte beschrieben (Fuster-Matanzo et al. 2013). So trägt etwa die Phagozytose apoptotischer neugebildeter Neurone durch Mikroglia zur Aufrechterhaltung der Homöostase der neurogenen Kaskade bei (Sierra et al. 2010). Durch Mikroglia sekretierte Faktoren unterstützen die neuronale Zelldifferenzierung, wie durchgeführte *in vitro*-Analysen nachweisen konnten (Walton et al. 2006). Allerdings werden durch aktivierte Mikrogliazellen auch (chronische) entzündliche Prozesse unterhalten, welche die hippocampale Neurogenese einschränken, indem sie das Überleben von Neuroblasten reduzieren (Belarbi et al. 2012; Ekdahl et al. 2003).

Eine signifikant verminderte Neurogeneserate in der SGZ des GD konnte bereits bei naiven sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen im Vergleich zu einer gleichalten WT-Kohorte beschrieben werden (Gerberding et al. 2019). Um jedoch einen Effekt der Behandlung mit dem NT4X-Antikörper auf die Neurogeneserate der Tg4-42-Mäuse zu untersuchen, wurden im Zuge dieses Forschungsprojekts sechsmonatige homozygote mit NT4X-immunisierte Tg4-42-Mäuse einer mit PBS behandelten Vergleichsgruppe gegenübergestellt und die DCX-positiven Neuronen quantifiziert (siehe Absatz 3.5). Die PBS-Kohorte exprimierte

dabei fast 18% mehr DCX-positive Nervenzellen als die mit dem NT4X-Antikörper immunisierten Tiere. Auch mikroskopisch zeigte die mit PBS behandelte Gruppe deutlich ausgeprägtere Perikarya mit weitläufigeren Axonen (siehe Abbildung 18).

Der in der vorliegenden Arbeit erbrachte Nachweis einer intraneuronalen  $A\beta_{42}$ -Expression im Bereich des GD (siehe Absatz 3.2) steht im Einklang mit der von Gerberding et al. (2019) beschriebenen reduzierten Neurogeneserate in transgenen Tg4-42-Tieren, die mit der  $A\beta$ -Belastung assoziiert wurde. Dieser Erklärungsansatz steht jedoch der höheren Neurogeneserate bei der mit PBS behandelten Mausgruppe entgegen. Der NT4X-Antikörper richtet sich vor allem gegen die oligomeren, N-trunkierten  $A\beta_{4-42}$ -Peptide (Y Bouter et al. 2015), welche im Tg4-42-Mausmodell ausschließlich exprimiert werden, sodass bei den mit NT4X behandelten Tieren von einer niedrigeren  $A\beta$ -Belastung und damit einer weniger beeinträchtigten Neurogeneserate auszugehen wäre.

Eine Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper konnte signifikant den Nervenzellverlust im Bereich des GD bei homozygoten Tg4-42-Mäusen vermindern (siehe Absatz 3.4.1). Die erhöhte Neurogeneserate in der PBS-Kohorte könnte ähnlich den Ergebnissen von K Jin et al. (2004a) als Kompensationsmechanismus gewertet werden, um die genannten Neuronenverluste zu kompensieren. Die beschriebene erheblich reduzierte Neurogeneserate bei transgenen Tg4-42-Tieren im Vergleich zu einer gleichalten WT-Kontrollgruppe (Gerberding et al. 2019) steht jedoch einem solchen Erklärungsansatz entgegen. Fraglich ist zudem auch, ob ein solcher Kompensationsmechanismus ausreichen würde, um die Nervenzellverluste auszugleichen.

In einem weiteren Experiment der vorliegenden Forschungsarbeit zeigte sich bei den betrachteten Tg4-42-Mäusen in der mit NT4X-immunisierten Tiergruppe im Vergleich zur PBS-Kohorte eine signifikant verringerte Mikrogliose (siehe Absatz 3.6.1). Eine Reduktion der Mikrogliaaktivität kann wiederum zu einer Abnahme neuroinflammatorischer Prozesse führen, die sich negativ auf die Neurogenese auswirken können, wenngleich auch proneurogene Effekte der Mikrogliazellen beschrieben werden (Fuster-Matanzo et al. 2013).

Insgesamt kann die adulte Neurogenese auch durch ihre vielschichtigen Modulationsmöglichkeiten als ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige therapeutische Strategien in der Alzheimertherapie betrachtet werden (Hollands et al. 2016).

#### **4.5 Neuroinflammatorische Prozesse im Bereich des Hippocampus unter der Immuntherapie mit NT4X**

Neben den  $A\beta$ -Ablagerungen und der Formation von NFT stellen inflammatorische Prozesse ein weiteres histopathologisches Charakteristikum des Morbus Alzheimer dar. Bereits durch Alois Alzheimer konnten reaktive Gliazellen innerhalb neuritischer Plaques beschrieben werden (Alzheimer 1907) und weitere Studien identifizierten reaktive Astrozyten und Mikrogliazellen vor allem in der Nähe von  $A\beta$ -Ablagerungen (Hemonnot et al. 2019). Es

kommt im Rahmen einer reaktiven Gliose zur konsekutiven Hochregulation von Komplementfaktoren, Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen und weiteren entzündungsfördernden Mediatoren (Akiyama et al. 2000). Darüber hinaus scheint der Ausprägungsgrad der Gliazellaktivierung mit dem Ausmaß der Hirnatrophie sowie den kognitiven Beeinträchtigungen zu korrelieren (Chun et al. 2018). Trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte wird jedoch weiterhin intensiv diskutiert, ob diese Glia-vermittelte Immunantwort eine Folge oder den Grund für eine progrediente Neurodegeneration darstellt (Fakhoury 2018). In den anhand des Tg4-42-Mausmodells durchgeführten Analysen sollte nachfolgend der Einfluss einer Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper auf entzündliche Prozesse im Hippocampusbereich untersucht werden.

#### **4.5.1 Die passive Immunisierung mit dem Antikörper NT4X führt bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Mikroglia**

Mikroglia sind ortsständige Makrophagen und repräsentieren rund 10% der Zellen des ZNS (Fakhoury 2018). Sie überwachen konstant ihre Umgebung und kontrollieren ebendiese auf das Vorkommen von Krankheitserregern oder Zelltrümmern und migrieren nach Aktivierung durch Pathogene zum Infektionsherd und können dort eine Immunantwort auslösen (Heneka et al. 2015). Abhängig von ihrem Aktivitätszustand lassen sich die Mikrogliazellen in einen proinflammatorischen M1-Phänotyp sowie einen antiinflammatorischen M2-Phänotyp einteilen (Tang und Le 2016). Diese starre Einteilung wird jedoch zunehmend hinterfragt, da hierbei komplexe Prozesse zu weit vereinfacht dargestellt sein würden (Ransohoff 2016). Den Mikroglia kommt in ihrer Funktion als Gewebemakrophagen auch eine wesentliche Rolle bei der Phagozytose sowie beim Abbau von A $\beta$ -Peptiden zu, wobei die Ausprägung der Entzündungsreaktion sowie die Mikrogliaaktivität diese Fähigkeiten beeinflussen können (CY Lee und Landreth 2010). Andererseits konnten mit AD assoziierbare kognitive Beeinträchtigungen anhand spezieller *in vivo* PET-Bildgebungen, welche bei AD-Patienten durchgeführt wurden, eher mit einer erhöhten Mikrogliaaktivität als mit der A $\beta$ -Belastung korreliert werden (Edison et al. 2008). Ausgehend von der aktuellen Studienlage lässt sich die Mikroglia-vermittelte Inflammation insgesamt als „zweischneidiges Schwert“ betrachten, die sowohl schädliche als auch vorteilhafte Funktionen im Rahmen der AD-Erkrankung übernehmen kann (Fakhoury 2018).

Klassischerweise wurden bislang vornehmlich extrazelluläre A $\beta$ -Plaques, NFT oder auch geschädigte Nervenzellen als Stimuli für neuroinflammatorische Prozesse angenommen (Akiyama 1994; Akiyama et al. 2000). So zeigten etwa extrazelluläre A $\beta$ -Plaques umgebende Mikrogliazellen eine erhöhte Expression entzündungsfördernd wirkender Faktoren wie beispielsweise Interleukin-1 (Cherry et al. 2014; Griffin et al. 1995). In jüngster Vergangenheit konnten jedoch auch Amyloidplaque-unabhängige Entzündungsreaktionen in APP transgenen Ratten beschrieben werden, welche eine durch intraneuronale A $\beta$ -Akkumulationen ausgelöste Mikrogliaaktivierung aufwiesen (Welikovitch et al. 2020). Im zeitlichen Kontext der

AD-Pathogenese gehen die intrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen der Formation von NFT sowie extrazellulären A $\beta$ -Plaques voraus (Fernandez-Vizarra et al. 2004; Wirths et al. 2001). Passend dazu konnten Y Bouter et al. (2013) bereits bei zweimonatigen hemizygoten Tg4-42-Mäusen eine signifikant erhöhte Astro- und Mikrogliose im Vergleich zu gleichalten WT-Tieren aufzeigen, was den Fokus auf intraneuronales A $\beta$  als wesentlichen Stimulus bestärkt, da im Tg4-42-Mausmodell extrazelluläre Amyloidplaques sowie NFT gänzlich fehlen (Y Bouter et al. 2014). Des Weiteren stellen sich bei homozygoten Tg4-42-Tieren signifikante Nervenzellverluste erst ab einem Mausalter von rund fünf Monaten ein (Antonios et al. 2015), was auch gegen die Annahme der Neurodegeneration als initialen Trigger der Glioseaktivität spricht und man dieser allenfalls eine verstärkende Wirkung zusprechen könnte.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zeigten im Vergleich zur WT-Kohorte bei der mit PBS behandelten Tg4-42-Mausgruppe eine um fast +112% gesteigerte Mikrogliaaktivität (siehe Absatz 3.6.1). Diese erheblich gesteigerte reaktive Mikrogliose ließ sich auch mikroskopisch anhand der immunhistochemischen Färbungen nachvollziehen (siehe Abbildung 20). Die mit NT4X immunisierten Tg4-42-Mäuse wiesen hingegen ausgehend von der PBS-Vergleichsgruppe eine deutliche Reduktion der Mikrogliazellen auf, was sich in einer prozentualen Reduktion von rund -75% ausdrückte. Damit konnte durch die Antikörperbehandlung eine signifikante Verminderung der reaktiven Mikrogliose erreicht werden. Betrachtet man diese Ergebnisse vor dem Hintergrund der potenziellen Funktionsweise des verwendeten NT4X-Antikörpers (siehe Absatz 4.3) und der im Tg4-42-Mausmodell nachgewiesenen A $\beta$ -Expression, dann könnte durch die Immunisierung mit NT4X über die konsekutive Reduktion der A $\beta$ -Belastung auch eine geringere Stimulation der Mikrogliazellen bedingt sein.

In der Vergangenheit konnte unter Verwendung von Anti-A $\beta$ -Antikörpern eine Mikrogliaaktivierung mit nachfolgender Phagozytose von A $\beta$ -Ablagerungen im Gehirn von PDAPP-Mäusen beschrieben werden (Bard et al. 2000). Bard et al. (2000) vermuteten als Kernmechanismus des A $\beta$ -Abbaus eine Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose durch Mikrogliazellen. Bezogen auf den NT4X-Antikörper zeigte sich jedoch, dass auch eine Immunisierung mit dem entsprechenden Fab-Fragment des Antikörpers bei Tg4-42-Mäusen den Neuronenverlust reduzieren und das Lernverhalten verbessern kann (Antonios et al. 2015). In einer anderen Studie zeigte sich unter der aktiven Immunisierung mit einem A $\beta$ 42-Antikörper (AN1792) eine Erhöhung der mikroglialen Phagozytoseaktivität, die jedoch nach umfassender Plaquentfernung unter den Wert der nicht-immunisierten Vergleichsgruppe absank (Zotova et al. 2011).

Abschließend fällt insgesamt eine Bewertung der erhobenen Ergebnisse schwer. Zum einen, weil weiterhin die Grundlagen der Mikrogliaaktivierung und die sich daraus ergebenden Auswirkungen zu großen Teilen unklar erscheinen, zum anderen bildet die Mikrogliose nur einen von vielen verschiedenen Aspekten der AD-Pathologie und damit potenzieller therapeuti-

scher Ansatzpunkte ab. Das gegenwärtig häufiger verfolgte Konzept die Aktivierung der Gliazellen beispielsweise durch PPAR-Agonisten zu einem anti-entzündlichen Phänotyp zu modulieren stellt einen interessanten und vielversprechenden Therapieansatz dar, welcher in der Zukunft weiter evaluiert werden sollte (Fakhoury 2018).

#### 4.5.2 Homozygote sechsmonatige Tg4-42-Mäuse zeigen eine gesteigerte Astroglie im Hippocampusbereich

Zumeist basieren Analysen neuroinflammatorischer Effekte auf gemessenen Veränderungen der Mikroglia-Aktivierung, obwohl an den entzündlichen Reaktionen neben Mikrogliazellen viele weitere Zelltypen, wie etwa Neurone, Astrozyten oder auch Oligodendrozyten beteiligt sein können (Welikovitch et al. 2020). Astrozyten sind der am häufigsten vorkommende Gliazelltyp des ZNS und essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns, indem sie Neurone mit Metaboliten und Wachstumsfaktoren versorgen, die Bildung von Synapsen unterstützen sowie das extrazelluläre Gleichgewicht von Ionen und Neurotransmittern regulieren (Colombo und Farina 2016). Zudem sind sie maßgeblich an der Aufrechterhaltung und Permeabilität der BHS beteiligt (NJ Abbott et al. 2006). Reaktive Astrogliazellen können durch eine erhöhte Expression von Proteinen der Intermediärfilamente wie beispielsweise dem sauren Gliafaserprotein oder Vimentin identifiziert werden (Chun et al. 2018).

Wie Mikrogliazellen können auch Astrozyten nach einer Exposition gegenüber A $\beta$  Zytokine, Interleukine, Stickoxide und andere potenziell zytotoxische Moleküle freisetzen, welche eine neuroinflammatorische Reaktion verstärken können (Heneka et al. 2015). Darüber hinaus besitzen Astrozyten ebenfalls die Fähigkeit A $\beta$ -Ablagerungen abzubauen und Defizite bei der astroglialen A $\beta$ -Clearance stehen im Verdacht zur AD-Pathogenese beizutragen (Wyss-Coray et al. 2003). So konnte etwa anhand des APP/PS1-Mausmodells gezeigt werden, dass eine Hemmung der reaktiven Astroglie mit einer stärkeren Ausprägung der A $\beta$ -Plauepathologie einhergehen kann (Kraft et al. 2013). Des Weiteren scheint das ApoE für die Astroglia-vermittelte A $\beta$ -Clearance von entscheidender Bedeutung zu sein (Koistinaho et al. 2004). Neben dem Abbau von Amyloid-Plaques, beschreiben einige Autoren jedoch auch eine mögliche Produktion von A $\beta$ -Peptiden durch Astrozyten, welche unter bestimmten inflammatorischen Bedingungen Zytokin-vermittelt erfolgen kann (Fakhoury 2018).

In diversen transgenen AD-Mauslinien, unter anderem Tg2576, PDAPP sowie 5xFAD, konnte eine Steigerung des A $\beta$ -Plaqueloads mit einer erhöhten Astrogliaaktivität korreliert werden (Games et al. 1995; Hsiao et al. 1996; Oakley et al. 2006). Eine reaktive Gliose konnte allerdings auch bereits vor dem Auftreten von A $\beta$ -Plaques in einigen transgenen Mauslinien, beispielsweise dem APP[V7171I]-Mausmodell, welches die London-Mutation des APP überexprimiert, beschrieben werden (Heneka et al. 2005). Im TBA42-Mausmodell, das vermehrt pyroglutamiertes A $\beta$ <sub>PE3-42</sub> exprimiert, konnte ebenfalls eine gesteigerte Astroglie beobachtet



werden, die mit ausgeprägten intrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen assoziiert wurde, da extrazelluläres A $\beta$  in den betrachteten Altersstufen der Mäuse nur äußerst selten nachgewiesen werden konnte (Wittnam et al. 2012). Auch im Tg4-42-Mausmodell zeigte sich, wie bereits oben erwähnt, bei zweimonatigen hemizygoten Mäusen eine signifikante Astroglie im Hippocampusbereich, welche sich mit den beobachteten intrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen und einem ausgeprägten Neuronenverlust in der CA1-Region korrelieren ließ (Y Bouter et al. 2013).

Bei den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen konnte im Hippocampusbereich ebenfalls eine im Verhältnis zu gleichalten WT-Tieren deutlich ausgeprägtere Astrogliaaktivität bestätigt werden (siehe Absatz 3.6.2). Auch bildmorphologisch konnte mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung in allen analysierten Arealen bei den transgenen Tieren eine deutliche reaktive Astroglie nachvollzogen werden (siehe Abbildung 24). Diese Ergebnisse bestärken den vermuteten Zusammenhang zwischen der bereits gezeigten intraneuronalen A $\beta$ -Expression in den Hippocampusarealen der Tg4-42-Tiere (siehe Absatz 3.2) und der gesteigerten Astrogliaaktivität in diesem Bereich. Zwischen den mit NT4X immunisierten sowie den mit PBS behandelten Tg4-42-Mäusen ließ sich hingegen kein signifikanter Unterschied evaluieren. In Anbetracht der durch die passive NT4X-Immunsierung anzunehmenden Reduzierung der A $\beta$ -Ablagerungen wäre ebenfalls von einer verminderten Astroglie der behandelten Tiere auszugehen.

In der Literatur werden ansteigende A $\beta$ -Spiegel mit konsekutiver Astrozytenaktivierung als ein frühes Ereignis der AD-Pathogenese beschrieben, welches noch vor Ausprägung kognitiver Beeinträchtigungen einsetzt und bevor erste klinische Symptome auftreten ein Plateau erreicht, während eine Mikrogliaaktivierung sowie Nervenzellverluste hingegen erst später auftreten und mit der Schwere der klinischen Symptome korreliert werden können (Chun et al. 2018; Jack et al. 2010). Somit könnte auch der gewählte Zeitpunkt der Immunsierung mit NT4X eine entscheidende Rolle in Bezug auf die im Rahmen dieser Analyse quantifizierte Astrogliaaktivität spielen. Olabarria et al. (2010) konnten jedoch anhand von Untersuchungen der 3xTg-Mauslinie zeigen, dass die Gesamtzahl an Astrozyten weder durch die AD-Pathologie selbst noch durch den Alterungsprozess an sich beeinflusst wird, sondern sich lediglich Änderungen ihrer Oberfläche beziehungsweise ihres Volumens fanden. Weiterführende Studien in Bezug auf die Astrogliaaktivität im Altersverlauf der homozygoten Tg4-42-Mäuse könnten dabei helfen, die Astroglie näher zu charakterisieren und einen potenziellen Einfluss einer Behandlung mit NT4X auf diese weiter zu eruieren.

## 5 Zusammenfassung

Die Alzheimerdemenz ist eine chronisch-progrediente neurodegenerative Erkrankung, die in ihrem Verlauf bei den betroffenen Patienten durch ausgeprägte kognitive Einschränkungen zu weitreichenden Beeinträchtigungen des täglichen Lebens führen kann. Wesentliche neuropathologische Veränderungen dieser Krankheit bilden intrazerebrale Amyloidablagerungen, NFT, neuroinflammatorische Prozesse sowie fortschreitende Neuronen- und Synapsenverluste. Nach der modifizierten Amyloidhypothese kommt insbesondere den intraneuronalen A $\beta$ -Ablagerungen eine entscheidende Rolle in der Alzheimer-Pathogenese zu. Besonders oligomere N-trunkierte A $\beta$ -Varianten, zu denen auch das häufig vorkommende A $\beta_{4-42}$ -Peptid zählt, tragen durch ihre ausgeprägte Aggregationsneigung und Stabilität zur A $\beta$ -vermittelten Toxizität bei. Das Tg4-42-Mausmodell, welches ausschließlich die A $\beta_{4-42}$ -Variante exprimiert, kann ohne das Vorhandensein von Mutationen in den APP- oder PS-Genen wesentliche Elemente des Morbus Alzheimer, wie Nervenzellverluste, intrazerebrale Entzündungsprozesse sowie Gedächtnisdefizite, reproduzieren.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde unter anderem das Expressionsmuster von A $\beta_{4-42}$  im Tg4-42-Mausmodell mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht. Dabei konnte neben der bereits vorbeschriebenen intraneuronalen A $\beta_{4-42}$ -Expression in der CA1-Region des Hippocampus auch ein A $\beta_{4-42}$ -Nachweis im Gyrus dentatus sowie der CA2/3-Region erbracht werden. Dies steht in logischem Einklang zu den nachfolgend stereologisch quantifizierten A $\beta$ -assoziierten Neuronenverlusten der sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäuse in diesen Hirnregionen. Es konnte ebenso eine signifikante Volumenreduktion des Gyrus dentatus bei diesen Tieren beschrieben werden. Zwischen jungen, dreimonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen und gleichalten Wildtypmäusen ließen sich hingegen noch keine signifikanten Unterschiede sowohl für die Nervenzellzahl als auch für das Volumen des Gyrus dentatus erheben, da sich diese erst im späteren Altersverlauf der Tiere zu entwickeln scheinen.

Durch die passive Immunisierung mit dem monoklonalen Antikörper NT4X, welcher unter anderem die N-terminal trunkierte A $\beta_{4-42}$ -Form bindet, konnte bereits in der Vergangenheit bei sechsmonatigen homozygoten Tg4-42-Mäusen, die ab einem Mausalter von drei Monaten für zwölf Wochen einer wöchentlichen Immunisierung mit NT4X unterzogen wurden, ein deutlicher Behandlungseffekt beschrieben werden. Der Nervenzellverlust in der CA1-Region dieser Tiere konnte durch die Behandlung signifikant abgeschwächt und Defizite im Lernverhalten der Mäuse eingedämmt werden. Um das therapeutische Potenzial des NT4X-Antikörpers weiter zu evaluieren, erfolgten in der vorliegenden Forschungsarbeit zusätzliche Quantifizierungen der Nervenzellzahl sowie des Volumens im Hippocampusbereich dieser immunisierten Tg4-42-Mäuse. Die mit NT4X immunisierten Tiere wiesen in der stereologischen Analyse rund 7% mehr Neurone im Bereich des Gyrus dentatus auf als die mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) behandelten Vergleichstiere, womit sich bezogen auf die Reduktion des Nervenzellverlustes ein signifikanter Behandlungseffekt zeigte. Für die

CA2/3-Region des Hippocampus ließ sich hingegen kein signifikanter Einfluss der NT4X-Immunsierung auf die Nervenzellzahl erheben. Ebenso zeigte die Antikörperbehandlung keinen Einfluss auf das Volumen der beiden betrachteten Hirnregionen, wengleich die mit NT4X immunisierten Tiere im Areal des Gyrus dentatus eine im Verhältnis zu den gleichalten Wildtypmäusen geringere Volumenreduktion aufwiesen als ihre PBS-Vergleichskohorte. Auch wenn der detaillierte Wirkmechanismus des NT4X-Antikörpers nicht abschließend geklärt ist, so kann am ehesten davon ausgegangen werden, dass diese beschriebenen Behandlungseffekte auf der gezielten Reduktion der A $\beta$ -induzierten Neurodegeneration basieren.

Um die Auswirkungen der NT4X-Immunsierung auf die hippocampale Neurogenese der Tg4-42-Mäuse näher zu charakterisieren, erfolgte eine Antikörperfärbung gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein Doublecortin (DCX). Die mit PBS behandelten Tg4-42-Mäuse exprimierten in der Analyse fast 18% mehr DCX-positive Nervenzellen als die mit dem NT4X-Antikörper immunisierten Tiere. Diese gesteigerte Neurogeneserate der PBS-Tiere könnte als ein Mechanismus zur Kompensation der vorbeschriebenen Neuronenverluste gedeutet werden, wengleich bei den mit NT4X immunisierten Tieren eigentlich von einer reduzierten A $\beta$ -Belastung und damit einer weniger beeinträchtigten Neurogenese auszugehen wäre.

In den folgenden Analysen neuroinflammatorischer Prozesse mittels DAB-Immunhistochemie zeigten die betrachteten Tg4-42-Mäuse eine deutlich gesteigerte Mikrogliaaktivität. Im Vergleich zu Wildtyptieren wiesen die mit PBS behandelten Mäuse eine um fast +112% gesteigerte Mikrogliose auf. Durch die Behandlung mit NT4X konnte dieser Entzündungsprozess um rund -75% reduziert werden. Dies ist ebenfalls am ehesten durch die NT4X-vermittelte Reduktion der A $\beta$ -Belastung mit nachfolgend geringerer Stimulation der Mikrogliazellen erklärbar. Bezogen auf die Astrogliose der transgenen Mäuse ließ sich hingegen kein Behandlungseffekt der NT4X-Immunsierung erkennen, wengleich die transgenen Tiere im Hippocampusbereich eine deutlich ausgeprägtere Astrogliaaktivität aufwiesen als die gleichalten Wildtyptiere.

Insgesamt konnte durch diese Forschungsarbeit das Tg4-42-Mausmodell weiter charakterisiert und der Einfluss des A $\beta_{4-42}$ -Peptids auf neurodegenerative sowie inflammatorische Prozesse im Hippocampusbereich untersucht werden. Die präventive passive Immunsierung mit dem NT4X-Antikörper konnte unter anderem signifikant den Neuronenverlust im Gyrus dentatus vermindern und die hippocampale Mikrogliaaktivität reduzieren. Abschließend bestärken diese Erkenntnisse erneut den therapeutischen Ansatzpunkt von zielgerichteten Therapien gegen A $\beta$ -Peptide und liefern weitere wichtige Grundlagen für den Einsatz des NT4X-Antikörpers für weiterführende klinische Studien.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbott LC, Nigussie F (2020): Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol* 49, 3-16

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53

ADI (2019): World Alzheimer Report 2019. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2019.pdf> abgerufen am 24.03.2020

Akiyama H (1994): Inflammatory response in Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med* 174, 295-303

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, et al. (2000): Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383-421

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

Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003): ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74, 342-352

Altman J, Das GD (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335

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

Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995): An English translation of Alzheimer's 1907 paper, „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8, 429-431

Alzheimer's Association (2020): 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* 16, 391-460

Amaral DG, Witter MP (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591

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

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

- Armstrong RA (2019): Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 57, 87-105
- Arndt JW, Qian F, Smith BA, Quan C, Kilambi KP, Bush MW, Walz T, Pepinsky RB, Bussiere T, Hamann S, et al. (2018): Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid-beta. *Sci Rep* 8, 6412
- Avchalumov Y, Mandyam CD (2021): Plasticity in the Hippocampus, Neurogenesis and Drugs of Abuse. *Brain Sci* 11, 404
- Babcock KR, Page JS, Fallon JR, Webb AE (2021): Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. *Stem Cell Reports* 16, 1-13
- Bacsikai BJ, Kajdasz ST, McLellan ME, Games D, Seubert P, Schenk D, Hyman BT (2002): Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy. *J Neurosci* 22, 7873-7878
- Bard F, Barbour R, Cannon C, Carretto R, Fox M, Games D, Guido T, Hoenow K, Hu K, Johnson-Wood K, et al. (2003): Epitope and isotype specificities of antibodies to beta - amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2023-2028
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, et al. (2000): Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916-919
- Barker WW, Luis CA, Kashuba A, Luis M, Harwood DG, Loewenstein D, Waters C, Jimison P, Shepherd E, Sevush S, et al. (2002): Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16, 203-212
- Bayer AJ, Bullock R, Jones RW, Wilkinson D, Paterson KR, Jenkins L, Millais SB, Donoghue S (2005): Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. *Neurology* 64, 94-101
- Bayer TA (2021): N-Truncated Abeta Starting at Position Four-Biochemical Features, Preclinical Models, and Potential as Drug Target in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 13, 710579
- 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
- Bayer TA, Wirths O (2011): Intraneuronal Abeta as a trigger for neuron loss: can this be translated into human pathology? *Biochem Soc Trans* 39, 857-861
- Bayer TA, Wirths O (2014): Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 127, 787-801
- Belarbi K, Arellano C, Ferguson R, Jopson T, Rosi S (2012): Chronic neuroinflammation impacts the recruitment of adult-born neurons into behaviorally relevant hippocampal networks. *Brain Behav Immun* 26, 18-23

- Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012): The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15, 349-357
- Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, Wilson RS (2006): Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 66, 1837-1844
- Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2013): Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 12, 92-104
- Birks J (2006): Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005593
- Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, Messer J, Oroszlan K, Rauchenberger R, Richter WF, et al. (2012): Gantenerumab: a novel human anti-Abeta antibody demonstrates sustained cerebral amyloid-beta binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid-beta. *J Alzheimers Dis* 28, 49-69
- Bottino CM, Castro CC, Gomes RL, Buchpiguel CA, Marchetti RL, Neto MR (2002): Volumetric MRI measurements can differentiate Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging. *Int Psychogeriatr* 14, 59-72
- Bouter C, Henniges P, Franke TN, Irwin C, Sahlmann CO, Sichler ME, Beindorff N, Bayer TA, Bouter Y (2018): (18)F-FDG-PET Detects Drastic Changes in Brain Metabolism in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 10, 425
- Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M, et al. (2013): N-truncated amyloid beta (Abeta) 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
- Bouter Y, Lopez Noguerola JS, Tucholla P, Crespi GA, Parker MW, Wiltfang J, Miles LA, Bayer TA (2015): Abeta targets of the biosimilar antibodies of Bapineuzumab, Crenezumab, Solanezumab in comparison to an antibody against Ntruncated Abeta in sporadic Alzheimer disease cases and mouse models. *Acta Neuropathol* 130, 713-729
- Bowman GL, Kaye JA, Quinn JF (2012): Dyslipidemia and blood-brain barrier integrity in Alzheimer's disease. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2012, 184042
- Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259
- Breyhan H, Wirths O, Duan K, Marcello A, Rettig J, Bayer TA (2009): APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. *Acta Neuropathol* 117, 677-685

- Brody DL, Holtzman DM (2008): Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci* 31, 175-193
- Brothers HM, Gosztyla ML, Robinson SR (2018): The Physiological Roles of Amyloid-beta Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 10, 118
- Brunnstrom HR, Englund EM (2009): Cause of death in patients with dementia disorders. *Eur J Neurol* 16, 488-492
- Buchman AS, Wilson RS, Bienias JL, Shah RC, Evans DA, Bennett DA (2005): Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* 65, 892-897
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998): Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395, 755-756
- Carriere I, Fourrier-Reglat A, Dartigues JF, Rouaud O, Pasquier F, Ritchie K, Ancelin ML (2009): Drugs with anticholinergic properties, cognitive decline, and dementia in an elderly general population: the 3-city study. *Arch Intern Med* 169, 1317-1324
- 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 Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165, 1289-1300
- Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, et al. (1994): Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 3, 569-574
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2014): Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* 11, 98
- Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M (2010): An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* 12, 1-12
- Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O (2010): Intracellular A $\beta$  triggers neuron loss in the cholinergic system of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 1153-1163
- Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel MC, Wirths O, Bayer TA (2008): Transient intraneuronal A beta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol* 116, 647-655
- Chun H, Marriott I, Lee CJ, Cho H (2018): Elucidating the Interactive Roles of Glia in Alzheimer's Disease Using Established and Newly Developed Experimental Models. *Front Neurol* 9, 797
- Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ (1994): Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11993-11997

- Clark CM, Schneider JA, Bedell BJ, Beach TG, Bilker WB, Mintun MA, Pontecorvo MJ, Hefti F, Carpenter AP, Flitter ML, et al. (2011): Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *JAMA* 305, 275-283
- Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL (2018): The Amyloid-beta Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis* 64, S567-S610
- Coleman PD, Flood DG (1987): Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 8, 521-545
- Colombo E, Farina C (2016): Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol* 37, 608-620
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Jr., Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. (1994): Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* 7, 180-184
- 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
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005): Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21, 1-14
- Cynis H, Scheel E, Saido TC, Schilling S, Demuth HU (2008): Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochemistry* 47, 7405-7413
- DAlzG (2018): Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. [https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1\\_haeufigkeit\\_demenzerkrankungen\\_dalzg.pdf](https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf) abgerufen am 24.03.2020
- DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Sereno L, Rodriguez M, Sanchez B, Hyman BT, Gomez-Isla T (2011): Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 70, 360-376
- Das P, Howard V, Loosbrock N, Dickson D, Murphy MP, Golde TE (2003): Amyloid-beta immunization effectively reduces amyloid deposition in FcRgamma<sup>-/-</sup> knock-out mice. *J Neurosci* 23, 8532-8538
- Demars M, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O (2010): Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res* 88, 2103-2117



- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001): Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8850-8855
- Demattos RB, Lu J, Tang Y, Racke MM, DeLong CA, Tzaferis JA, Hole JT, Forster BM, McDonnell PC, Liu F, et al. (2012): A plaque-specific antibody clears existing beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron* 76, 908-920
- DeTure MA, Dickson DW (2019): The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 14, 32
- Dickerson BC, Bakkour A, Salat DH, Feczko E, Pacheco J, Greve DN, Grodstein F, Wright CI, Blacker D, Rosas HD, et al. (2009): The cortical signature of Alzheimer's disease: regionally specific cortical thinning relates to symptom severity in very mild to mild AD dementia and is detectable in asymptomatic amyloid-positive individuals. *Cereb Cortex* 19, 497-510
- Dickerson BC, Stoub TR, Shah RC, Sperling RA, Killiany RJ, Albert MS, Hyman BT, Blacker D, Detolledo-Morrell L (2011): Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology* 76, 1395-1402
- Dickson DW (1997): The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 321-339
- Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1992): Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 13, 179-189
- Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, et al. (2002): Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5, 452-457
- Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I (2000): Smoking and dementia in male British doctors: prospective study. *BMJ* 320, 1097-1102
- Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, Raman R, Sun X, Aisen PS, et al. (2014): Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370, 311-321
- Dunys J, Valverde A, Checler F (2018): Are N- and C-terminally truncated Abeta species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *J Biol Chem* 293, 15419-15428
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B (2008): Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115, 5-38
- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Müller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K (1988): Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7, 949-957
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5, 486-488

- Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A, et al. (2008): Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol Dis* 32, 412-419
- Edwards G, 3rd, Zhao J, Dash PK, Soto C, Moreno-Gonzalez I (2020): Traumatic Brain Injury Induces Tau Aggregation and Spreading. *J Neurotrauma* 37, 80-92
- Eimer WA, Vassar R (2013): Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener* 8, 2
- Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003): Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13632-13637
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R (2010): Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77, 69-81
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000): Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25, 1439-1451
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317
- Esang M, Gupta M (2021): Aducanumab as a Novel Treatment for Alzheimer's Disease: A Decade of Hope, Controversies, and the Future. *Cureus* 13, e17591
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990): Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122-1124
- Fagan T (2020): Biogen Asks FDA To Approve Aducanumab. <https://www.alzforum.org/news/research-news/biogen-asks-fda-approve-aducanumab> abgerufen am 01.08.2020
- Fakhoury M (2018): Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr Neuropharmacol* 16, 508-518
- Farlow M, Arnold SE, van Dyck CH, Aisen PS, Snider BJ, Porsteinsson AP, Friedrich S, Dean RA, Gonzales C, Sethuraman G, et al. (2012): Safety and biomarker effects of solanezumab in patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 8, 261-271
- Faure A, Verret L, Bozon B, El Tannir El Tayara N, Ly M, Kober F, Dhenain M, Rampon C, Delatour B (2011): Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32, 407-418
- Fernandez-Vizarra P, Fernandez AP, Castro-Blanco S, Serrano J, Bentura ML, Martinez-Murillo R, Martinez A, Rodrigo J (2004): Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol* 19, 823-844
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975): "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12, 189-198

Franklin KBJ, Paxinos G: The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2. Auflage; Academic Press, San Diego 2001

Fratiglioni L, Wang HX (2007): Brain reserve hypothesis in dementia. *J Alzheimers Dis* 12, 11-22

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

Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP (1996): Activation of K<sup>+</sup> channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379, 74-78

Fuster-Matanzo A, Llorens-Martin M, Hernandez F, Avila J (2013): Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm* 2013, 260925

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. (1995): Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-527

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

Glenner GG, Wong CW (1984a): Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1131-1135

Glenner GG, Wong CW (1984b): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-890

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704-706

Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997): Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41, 17-24

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

Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, Perls TT, Lipsitz LA, Hyman BT (1996b): Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 39, 62-70

- Gould E, Tanapat P (1999): Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 46, 1472-1479
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, et al. (2000): Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156, 15-20
- Griffin WS, Sheng JG, Roberts GW, Mrak RE (1995): Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 276-281
- Grüning CS, Klinker S, Wolff M, Schneider M, Toksoz K, Klein AN, Nagel-Steger L, Willbold D, Hoyer W (2013): The off-rate of monomers dissociating from amyloid-beta protofibrils. *J Biol Chem* 288, 37104-37111
- Gudala K, Bansal D, Schifano F, Bhansali A (2013): Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *J Diabetes Investig* 4, 640-650
- Gyure KA, Durham R, Stewart WF, Smialek JE, Troncoso JC (2001): Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 125, 489-492
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012): Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006270
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. (1992): Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322-325
- Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383-388
- Hardy JA, Higgins GA (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185
- Hefti F, Goure WF, Jerecic J, Iverson KS, Walicke PA, Krafft GA (2013): The case for soluble Abeta oligomers as a drug target in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 34, 261-266
- Hemonnot AL, Hua J, Ulmann L, Hirbec H (2019): Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities. *Front Aging Neurosci* 11, 233
- Henderson SJ, Andersson C, Narwal R, Janson J, Goldschmidt TJ, Appelkvist P, Bogstedt A, Steffen AC, Haupts U, Tebbe J, et al. (2014): Sustained peripheral depletion of amyloid-beta with a novel form of neprilysin does not affect central levels of amyloid-beta. *Brain* 137, 553-564
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, et al. (2015): Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14, 388-405

- Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F (2005): Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2, 22
- Herrup K (2010): Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci* 30, 16755-16762
- Hollands C, Bartolotti N, Lazarov O (2016): Alzheimer's Disease and Hippocampal Adult Neurogenesis; Exploring Shared Mechanisms. *Front Neurosci* 10, 178
- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011): Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3, 77sr71
- Honig LS, Vellas B, Woodward M, Boada M, Bullock R, Borrie M, Hager K, Andreasen N, Scarpini E, Liu-Seifert H, et al. (2018): Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 378, 321-330
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996): Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102
- Hüttenrauch M, Brauss A, Kurdakova A, Borgers H, Klinker F, Liebetanz D, Salinas-Riester G, Wiltfang J, Klafki HW, Wirths O (2016): Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model. *Transl Psychiatry* 6, e800
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, et al. (2012): National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 8, 1-13
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989): Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24, 173-182
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 1-9
- Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ (2010): Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* 9, 119-128
- Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2012): Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 196.e129-196.e140
- Jawhar S, Wirths O, Bayer TA (2011): Pyroglutamate amyloid-beta (Abeta): a hatchet man in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286, 38825-38832

- Jia L, Fu Y, Shen L, Zhang H, Zhu M, Qiu Q, Wang Q, Yan X, Kong C, Hao J, et al. (2020): PSEN1, PSEN2, and APP mutations in 404 Chinese pedigrees with familial Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 16, 178-191
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA (2004a): Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13363-13367
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004b): Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 343-347
- Jin X (2016): The role of neurogenesis during development and in the adult brain. *Eur J Neurosci* 44, 2291-2299
- Johnson GV, Jenkins SM (1999): Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis* 1, 307-328
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736
- Kempermann G, Song H, Gage FH (2015): Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018812
- Kidd M (1963): Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192-193
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009): The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63, 287-303
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003): Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6382-6387
- Kirk-Sanchez NJ, McGough EL (2014): Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives. *Clin Interv Aging* 9, 51-62
- Klein G, Delmar P, Voyle N, Rehal S, Hofmann C, Abi-Saab D, Andjelkovic M, Ristic S, Wang G, Bateman R, et al. (2019): Gantenerumab reduces amyloid-beta plaques in patients with prodromal to moderate Alzheimer's disease: a PET substudy interim analysis. *Alzheimers Res Ther* 11, 101
- Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, et al. (2005): Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med* 11, 556-561
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, et al. (2004): Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10, 719-726

- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, Gil SC, Brown J, Wilhelmsson U, Restivo JL, et al. (2013): Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J* 27, 187-198
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027-2033
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010): ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29, 3020-3032
- Kummer MP, Heneka MT (2014): Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther* 6, 28
- Kunkle BW, Vardarajan BN, Naj AC, Whitehead PL, Rolati S, Slifer S, Carney RM, Cuccaro ML, Vance JM, Gilbert JR, et al. (2017): Early-Onset Alzheimer Disease and Candidate Risk Genes Involved in Endolysosomal Transport. *JAMA Neurol* 74, 1113-1122
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007): Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8, 499-509
- Lane CA, Hardy J, Schott JM (2018): Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25, 59-70
- Lazarov O, Marr RA (2010): Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. *Exp Neurol* 223, 267-281
- Lazarov O, Mattson MP, Peterson DA, Pimplikar SW, van Praag H (2010): When neurogenesis encounters aging and disease. *Trends Neurosci* 33, 569-579
- Lee CY, Landreth GE (2010): The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm (Vienna)* 117, 949-960
- Lee EB, Leng LZ, Zhang B, Kwong L, Trojanowski JQ, Abel T, Lee VM (2006): Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem* 281, 4292-4299
- Leitlinie Demenzen (2016): S3-Leitlinie Demenzen (Langversion – Januar 2016), Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) / Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/038-013l\\_S3-Demenzen-2016-07.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/038-013l_S3-Demenzen-2016-07.pdf) abgerufen am 26.03.20
- Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH (2008): Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 151, 745-749
- Lopez-Toledano MA, Shelanski ML (2004): Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. *J Neurosci* 24, 5439-5444
- Lopez-Toledano MA, Shelanski ML (2007): Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind). *J Alzheimers Dis* 12, 229-240

- Luskin MB (1993): Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189
- Maclin JMA, Wang T, Xiao S (2019): Biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease, dementia Lewy body, frontotemporal dementia and vascular dementia. *Gen Psychiatr* 32, e100054
- Mahley RW (1988): Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630
- Mantile F, Prisco A (2020): Vaccination against beta-Amyloid as a Strategy for the Prevention of Alzheimer's Disease. *Biology (Basel)* 9, 0425
- Marlatt MW, Lucassen PJ (2010): Neurogenesis and Alzheimer's disease: Biology and pathophysiology in mice and men. *Curr Alzheimer Res* 7, 113-125
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985a): 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
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985b): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245-4249
- Mattson MP (1997): Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77, 1081-1132
- Mayeux R, Stern Y (2012): Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006239
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, et al. (2011): The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 263-269
- Mendez MF (2019): Early-onset Alzheimer Disease and Its Variants. *Continuum (Minneapolis)* 25, 34-51
- Middleton SJ, McHugh TJ (2020): CA2: A Highly Connected Intrahippocampal Relay. *Annu Rev Neurosci* 43, 55-72
- Moreno-Jimenez EP, Flor-Garcia M, Terreros-Roncal J, Rabano A, Cafini F, Pallas-Bazarra N, Avila J, Llorens-Martin M (2019): Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med* 25, 554-560
- Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguchi H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA (2002): Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 9, 88-102



- Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ (1992): Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267, 17082-17086
- Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P (2018): Amyloid beta oligomers (AbetaOs) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 125, 177-191
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992): A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1, 345-347
- Musiek ES, Gomez-Isla T, Holtzman DM (2021): Aducanumab for Alzheimer disease: the amyloid hypothesis moves from bench to bedside. *J Clin Invest* 131, e154889
- Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H (2005): The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 53, 695-699
- Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO (2003): Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9, 448-452
- O'Brien RJ, Wong PC (2011): Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 34, 185-204
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, et al. (2006): Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129-10140
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409-421
- Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM (2006): A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am J Pathol* 168, 184-194
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004): Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbria and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88, 844-856
- Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodriguez JJ (2010): Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia* 58, 831-838
- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, et al. (2003): Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46-54
- Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, Ashford E, Retout S, Hofmann C, Delmar P, et al. (2017): A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 9, 95

Padurariu M, Ciobica A, Mavroudis I, Fotiou D, Baloyannis S (2012): Hippocampal neuronal loss in the CA1 and CA3 areas of Alzheimer's disease patients. *Psychiatr Danub* 24, 152-158

Pais M, Martinez L, Ribeiro O, Loureiro J, Fernandez R, Valiengo L, Canineu P, Stella F, Talib L, Radanovic M, et al. (2020): Early diagnosis and treatment of Alzheimer's disease: new definitions and challenges. *Braz J Psychiatry* 42, 431-441

Panza F, Lozupone M, Seripa D, Imbimbo BP (2019): Amyloid-beta immunotherapy for alzheimer disease: Is it now a long shot? *Ann Neurol* 85, 303-315

Pardossi-Piquard R, Checler F (2012): The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 109-124

Perl DP (2010): Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77, 32-42

Petersen RC, Lopez O, Armstrong MJ, Getchius TSD, Ganguli M, Gloss D, Gronseth GS, Marson D, Pringsheim T, Day GS, et al. (2018): Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 90, 126-135

Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW (1995a): Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 132, 172-179

Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW (1995b): Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270, 23895-23898

Pimplikar SW (2009): Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1261-1268

Plotkin SS, Cashman NR (2020): Passive immunotherapies targeting A $\beta$  and tau in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 144, 105010

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

Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, et al. (2004): A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113, 1456-1464

Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL (1991): The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 12, 295-312

Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV (2010): Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders. *Biol Psychiatry* 67, 505-512

Radde R, Duma C, Goedert M, Jucker M (2008): The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 Suppl 1, S70-S74

- Rademakers R, Rovelet-Lecrux A (2009): Recent insights into the molecular genetics of dementia. *Trends Neurosci* 32, 451-461
- Ransohoff RM (2016): A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 19, 987-991
- Redwine JM, Kosofsky B, Jacobs RE, Games D, Reilly JF, Morrison JH, Young WG, Bloom FE (2003): Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1381-1386
- Reinert J, Richard BC, Klafki HW, Friedrich B, Bayer TA, Wiltfang J, Kovacs GG, Ingelsson M, Lannfelt L, Paetau A, et al. (2016): Deposition of C-terminally truncated Abeta species Abeta37 and Abeta39 in Alzheimer's disease and transgenic mouse models. *Acta Neuropathol Commun* 4, 24
- Reitz C, Mayeux R (2014): Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88, 640-651
- Ricciarelli R, Fedele E (2017): The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol* 15, 926-935
- Rodriguez JJ, Jones VC, Tabuchi M, Allan SM, Knight EM, LaFerla FM, Oddo S, Verkhratsky A (2008): Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 3, e2935
- Rolland Y, Pillard F, Klapouszczak A, Reynish E, Thomas D, Andrieu S, Riviere D, Vellas B (2007): Exercise program for nursing home residents with Alzheimer's disease: a 1-year randomized, controlled trial. *J Am Geriatr Soc* 55, 158-165
- Rosen GD, Harry JD (1990): Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *J Neurosci Methods* 35, 115-124
- Rygiel K (2016): Novel strategies for Alzheimer's disease treatment: An overview of anti-amyloid beta monoclonal antibodies. *Indian J Pharmacol* 48, 629-636
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S (1995): Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457-466
- Saito T, Saido TC (2018): Neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease. *Clin Exp Neuroimmunol* 9, 211-218
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Ferris S, et al. (2014): Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370, 322-333
- Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Doody R, van Dyck CH, et al. (2009): A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 73, 2061-2070

- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1996): APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 777, 281-287
- Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA (2006): Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 59, 912-921
- Scheff SW, Price DA (1993): Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 33, 190-199
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, et al. (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173-177
- Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth HU (2004): Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett* 563, 191-196
- Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, Heiser U, Francke M, Kehlen A, Holzer M, Hutter-Paier B, Prokesch M, Windisch M, et al. (2008): Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14, 1106-1111
- Schmidt R, Hofer E, Bouwman FH, Buerger K, Cordonnier C, Fladby T, Galimberti D, Georges J, Heneka MT, Hort J, et al. (2015): EFNS-ENS/EAN Guideline on concomitant use of cholinesterase inhibitors and memantine in moderate to severe Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 22, 889-898
- Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813-831
- Schneider LS, Dagerman KS, Higgins JP, McShane R (2011): Lack of evidence for the efficacy of memantine in mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68, 991-998
- Selkoe DJ (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011a): Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a006189
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gomez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT (2011b): Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 179, 1373-1384
- Sevaille J, Amoyel A, Robert P, Fournie-Zaluski MC, Roques B, Checler F (2009): Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 109, 248-256
- Sevigny J, Chiao P, Bussiere T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, et al. (2016): The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537, 50-56
- Sichler ME, Low MJ, Schleicher EM, Bayer TA, Bouter Y (2019): Reduced Acoustic Startle Response and Prepulse Inhibition in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Rep* 3, 269-278

- Siemers ER, Friedrich S, Dean RA, Gonzales CR, Farlow MR, Paul SM, Demattos RB (2010): Safety and changes in plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta after a single administration of an amyloid beta monoclonal antibody in subjects with Alzheimer disease. *Clin Neuropharmacol* 33, 67-73
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010): Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483-495
- Silva MVF, Loures CMG, Alves LCV, de Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG (2019): Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci* 26, 33
- Simic G, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N (1997): Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 379, 482-494
- Sisodia SS (1992): Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6075-6079
- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL (1990): Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492-495
- Skoog I, Lernfelt B, Landahl S, Palmertz B, Andreasson LA, Nilsson L, Persson G, Oden A, Svanborg A (1996): 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* 347, 1141-1145
- Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E (1997): Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4109-4112
- Solomon B, Koppel R, Hanan E, Katzav T (1996): Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 452-455
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, et al. (2018): Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377-381
- Sotthibundhu A, Li QX, Thangnipon W, Coulson EJ (2009): Aβ(1-42) stimulates adult SVZ neurogenesis through the p75 neurotrophin receptor. *Neurobiol Aging* 30, 1975-1985
- Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Bostrom E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, et al. (2013): Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-1227
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, et al. (2011): Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 280-292
- Steiner H, Fukumori A, Tagami S, Okochi M (2018): Making the final cut: pathogenic amyloid-beta peptide generation by gamma-secretase. *Cell Stress* 2, 292-310

- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993): Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977-1981
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, et al. (1997): Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13287-13292
- Sung PS, Lin PY, Liu CH, Su HC, Tsai KJ (2020): Neuroinflammation and Neurogenesis in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 21, 701
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994): An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264, 1336-1340
- Tang Y, Le W (2016): Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol* 53, 1181-1194
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL (1987): Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884
- Tariot PN, Lopera F, Langbaum JB, Thomas RG, Hendrix S, Schneider LS, Rios-Romenets S, Giraldo M, Acosta N, Tobon C, et al. (2018): The Alzheimer's Prevention Initiative Autosomal-Dominant Alzheimer's Disease Trial: A study of crenezumab versus placebo in preclinical PSEN1 E280A mutation carriers to evaluate efficacy and safety in the treatment of autosomal-dominant Alzheimer's disease, including a placebo-treated noncarrier cohort. *Alzheimers Dement (N Y)* 4, 150-160
- Tew J, Goate AM (2017): Genetics of beta-Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, a024539
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991): Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30, 572-580
- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H (2006): The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ* 2006, re1
- Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma H, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T, et al. (2010): A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci* 30, 4845-4856
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006): Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572, 477-492

- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999): Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13427-13431
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005): Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25, 8680-8685
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, et al. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735-741
- Verma M, Vats A, Taneja V (2015): Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. *Ann Indian Acad Neurol* 18, 138-145
- Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, Kern S, Ousset PJ, Maruff P, Skoog I, et al. (2019): Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement* 15, 888-898
- Walker JR, Pacoma R, Watson J, Ou W, Alves J, Mason DE, Peters EC, Urbina HD, Welzel G, Althage A, et al. (2013): Enhanced proteolytic clearance of plasma A $\beta$  by peripherally administered neprilysin does not result in reduced levels of brain A $\beta$  in mice. *J Neurosci* 33, 2457-2464
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002): Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535-539
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007): A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172-1184
- Walter S, Jumpertz T, Hüttenrauch M, Ogorek I, Gerber H, Storck SE, Zampar S, Dimitrov M, Lehmann S, Lepka K, et al. (2019): The metalloprotease ADAMTS4 generates N-truncated A $\beta$ 4-x species and marks oligodendrocytes as a source of amyloidogenic peptides in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 137, 239-257
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, 2nd, Scheffler B, Steindler DA (2006): Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54, 815-825
- Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, et al. (2002): Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924, 133-140
- Wang R, Meschia JF, Cotter RJ, Sisodia SS (1991): Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *J Biol Chem* 266, 16960-16964
- Watt AD, Crespi GA, Down RA, Ascher DB, Gunn A, Perez KA, McLean CA, Villemagne VL, Parker MW, Barnham KJ, et al. (2014): Do current therapeutic anti-A $\beta$  antibodies for Alzheimer's disease engage the target? *Acta Neuropathol* 127, 803-810

- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-1862
- Welikovitch LA, Do Carmo S, Magloczky Z, Malcolm JC, Loke J, Klein WL, Freund T, Cuello AC (2020): Early intraneuronal amyloid triggers neuron-derived inflammatory signaling in APP transgenic rats and human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 6844-6854
- West MJ (2002): Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog Brain Res* 135, 43-51
- West MJ (2012): Introduction to stereology. *Cold Spring Harb Protoc* 2012, pdb.top070623
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994): Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344, 769-772
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004): Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25, 1205-1212
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991): Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231, 482-497
- Wildburger NC, Esparza TJ, LeDuc RD, Fellers RT, Thomas PM, Cairns NJ, Kelleher NL, Bateman RJ, Brody DL (2017): Diversity of Amyloid-beta Proteoforms in the Alzheimer's Disease Brain. *Sci Rep* 7, 9520
- Winblad B, Jones RW, Wirth Y, Stoffler A, Mobius HJ (2007): Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dement Geriatr Cogn Disord* 24, 20-27
- Winner B, Winkler J (2015): Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021287
- Wirhns O (2017): Altered neurogenesis in mouse models of Alzheimer disease. *Neurogenesis (Austin)* 4, e1327002
- Wirhns O, Bayer TA (2010): Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010, 723782
- Wirhns O, Bethge T, Marcello A, Harmeier A, Jawhar S, Lucassen PJ, Multhaup G, Brody DL, Esparza T, Ingelsson M, et al. (2010): Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm (Vienna)* 117, 85-96
- Wirhns 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
- Wirhns O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA (2001): Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 306, 116-120



- Wirhth O, Zampar S (2019): Emerging roles of N- and C-terminally truncated Aβ species in Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets* 23, 991-1004
- Wirhth O, Zampar S (2020): Neuron Loss in Alzheimer's Disease: Translation in Transgenic Mouse Models. *Int J Mol Sci* 21, 8144
- Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD (1976): Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 27, 173-181
- Wittnam JL, Portelius E, Zetterberg H, Gustavsson MK, Schilling S, Koch B, Demuth HU, Blennow K, Wirhth O, Bayer TA (2012): Pyroglutamate amyloid beta (Aβ) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 8154-8162
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003): Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9, 453-457
- Wyss-Coray T, Rogers J (2012): Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006346
- Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T (2009): Aβ immunotherapy: intracerebral sequestration of Aβ by an anti-Aβ monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Aβ. *J Neurosci* 29, 11393-11398
- Zakzanis KK, Graham SJ, Campbell Z (2003): A meta-analysis of structural and functional brain imaging in dementia of the Alzheimer's type: a neuroimaging profile. *Neuropsychol Rev* 13, 1-18
- Zampar S, Wirhth O: Immunotherapy Targeting Amyloid-beta Peptides in Alzheimer's Disease. In: Huang, X (Hrsg.): *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. 1. Auflage; Exon Publications, Brisbane (AU) 2020, 23-49
- Zannis VI, Just PW, Breslow JL (1981): Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 33, 11-24
- Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H (2012): Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 9-21
- Zheng H, Koo EH (2006): The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5
- Zheng H, Koo EH (2011): Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6, 27
- Zotova E, Holmes C, Johnston D, Neal JW, Nicoll JA, Boche D (2011): Microglial alterations in human Alzheimer's disease following Aβ42 immunization. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37, 513-524

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einen besonderen Dank an nachstehende Personen aussprechen ohne deren Mithilfe, Unterstützung und Verständnis dieses Promotionsvorhaben nicht hätte erfolgen können.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas A. Bayer, welcher mir dieses spannende Forschungsthema anvertraute und mir die experimentelle Durchführung in seiner Arbeitsgruppe für Molekulare Psychiatrie ermöglichte. Er hatte immer ein offenes Ohr und stand mir stets mit Geduld, Enthusiasmus sowie konstruktiven Ratschlägen zur Seite.

Ebenso möchte ich mich bei Frau PD Dr. Yvonne Bouter bedanken, die mich geduldig in die Labortätigkeiten einarbeitete und mich während der gesamten Zeit mit Rat und Tat unterstützte.

Ein weiterer Dank gebührt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Oliver Wirths, der mir mit seiner fachlichen Kompetenz sowie einigen Denkanstößen jederzeit gerne weitergeholfen hat. Sämtlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Molekulare Psychiatrie danke ich für die freundliche Aufnahme ins Team und die gute Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Frau Petra Tucholla für ihre Hilfsbereitschaft und die Organisation des täglichen Laborablaufs danken. Besonders hervorzuheben sind meine beiden Mitstreiter Nicolai Gießen und Maximilian Ueberück, mit denen ich während der gemeinsamen Laborzeit viele vergnügliche Stunden verbringen durfte und die zu guten Freunden geworden sind. Weiterer Dank gilt insbesondere meiner Partnerin Gwendolyn Haas für das Korrekturlesen dieser Forschungsarbeit.