

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

**Auswirkung von *Enriched Environment*
auf hippocampalen Nervenzellverlust
und Gedächtnisfunktionen im
Mausmodell Tg4-42**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Andreas Martin Brauß

aus

Neuburg a. d. Donau

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in Prof. Dr. rer. nat. O. Wirths
Ko-Referent/in:
Drittreferent/in:
Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel " Auswirkung von *Enriched Environment* auf hippocampalen Nervenzellverlust und Gedächtnisfunktionen im Mausmodell Tg4-42" 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

Fachartikel

Hüttenrauch M, **Brauß A**, Kurdakova A, Borgers H, Klinker F, Liebetanz D, Salinas-Riester G, Wiltfang J, Klafki HW, Wirths O (2016a): Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model. *Transl Psychiatry* 6, e800

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

Abstracts

Wirths O, **Brauß A**, Kurdakova A, Hüttenrauch M, Bayer TA (2015): Physical activity ameliorates neuron loss and memory deficits in Tg4-42 mice. Poster presentation, The International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Neurodegener Diseases* 2015(suppl 1): 352-1969, 1022

Hüttenrauch M, **Brauß A**, Kurdakova A, Klafki H, Wiltfang J, Wirths O. Physical activity ameliorates neuron loss and behavioral deficits in Tg4-42 mice. *Pharmacopsychiatry* 2015; 48 - A22

Wirths O, **Brauß A**, Kurdakova A, Walter S, Salinas G, Klafki HW, Wiltfang J, Weggen S, Bayer TA, Hüttenrauch M. Effects of long-term environmental enrichment in the Tg4-42 and 5XFAD mouse models of Alzheimer's disease. *Neurodegener Diseases* 2017;17(suppl 1): 591-1890, 1110

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Morbus Alzheimer	1
1.2 Epidemiologische Daten	1
1.3 Risikofaktoren.....	1
1.3.1 Nicht-genetische Risikofaktoren.....	1
1.3.2 Genetische Risikofaktoren.....	2
1.4 Klinischer Verlauf und Symptome	4
1.5 Diagnostik.....	5
1.6 Neuropathologische Charakteristika	6
1.6.1 Amyloid-Ablagerungen.....	6
1.6.2 Neurofibrillenbündel	7
1.6.3 Kortikale Atrophie und Nervenzellverlust.....	8
1.7 Pathogenese des M. Alzheimer.....	8
1.7.1 Das <i>amyloid precursor protein</i>	8
1.7.2 Amyloid-Hypothese.....	10
1.7.3 Modifizierte Amyloid-Hypothese	11
1.8 Amyloid- β -Aggregation.....	13
1.9 Amyloid-Varianten.....	14
1.9.1 $A\beta_{4-42}$	15
1.10 Mausmodelle des Morbus Alzheimer.....	16
1.11 Therapie.....	17
1.12 Kognitive Reserve	21
1.13 <i>Enriched Environment</i>	23
1.14 Hypothese und Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2 Material und Methoden	27
2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau.....	27
2.2 Verwendete Tiere	28
2.2.1 Das Mausmodell Tg4-42 _{hom}	28
2.3 Tierhaltung	30
2.3.1 Standardhaltung.....	30
2.3.2 <i>Enriched Environment</i>	30

2.4	Genotypisierung	31
2.4.1	DNS-Isolierung	31
2.4.2	Bestimmung der DNS-Konzentration.....	32
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	32
2.4.4	Gelelektrophorese	33
2.5	Gewinnung des murinen Hirngewebes.....	34
2.5.1	Perfusion und Kryoprotektion.....	34
2.5.2	Herstellung der Hirngewebeschnitte.....	35
2.6	Bestimmung der Neuronenzahl im CA1	35
2.6.1	Färbung der Gewebeschnitte mittels Kresylviolett.....	35
2.6.2	Stereologie	36
2.7	Motorik- und Verhaltenstests.....	38
2.7.1	<i>String Suspension Test</i>	39
2.7.2	<i>Balance Beam Test</i>	40
2.7.3	<i>Morris Water Maze Test</i>	41
2.7.4	<i>Cross Maze Test</i>	47
2.8	Statistik.....	48
2.9	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	49
2.10	Chemikalien und Reagenzien.....	50
2.11	Software	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Nachweis des Tg4-42-Transgens bei allen untersuchten Tieren	52
3.2	Motortests.....	53
3.2.1	Homozygote Mäuse des Typs Tg4-42 zeigen keine Verluste ihrer motorischen Fähigkeiten in den untersuchten Altersgruppen	53
3.2.2	<i>Enriched Environment</i> führt nicht zu einer signifikanten Verbesserung der motorischen Fähigkeiten	54
3.3	<i>Morris Water Maze Test</i>	55
3.3.1	Verlust der Fähigkeit des räumlichen Bezugsgedächtnisses im Altersverlauf bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen	55
3.3.2	<i>Enriched Environment</i> rettet Defizite des räumlichen Lernens im <i>Morris Water Maze Test</i> bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen.....	59
3.4	<i>Cross Maze Test</i>	62
3.4.1	Kein Verlust von Funktionen des Arbeitsgedächtnisses von Tg4-42 _{hom} -Mäusen im <i>Cross Maze Test</i>	62
3.4.2	<i>Enriched Environment</i> führt nicht zu einer signifikanten Steigerung des Arbeitsgedächtnisses im <i>Cross Maze Test</i>	62
3.5	Stereologie	63
3.5.1	Tg4-42 _{hom} Mäuse zeigen im Altersverlauf einen deutlich zunehmenden hippocampalen Neuronenverlust in der CA1-Region	63
3.5.2	<i>Enriched Environment</i> verzögert hippocampalen Neuronenverlust im Abschnitt CA1	64

4	Diskussion	65
4.1	$A\beta_{4-42}$ als Ursache des zunehmenden Untergangs von Neuronen im Hippocampus und konsekutiven Verhaltensdefiziten im Altersverlauf beim transgenen Mausmodell Tg4-42 _{hom}	65
4.2	<i>Enriched Environment</i> bremst den hippocampalen Neuronenverlust beim Mausmodell Tg4-42 _{hom} und stellt Defizite des räumlichen Lernens wieder her	71
5	Zusammenfassung	77
6	Literaturverzeichnis	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Spaltung des <i>amyloid precursor proteins</i> (APP).....	10
Abbildung 2: Amyloidhypothesen.....	13
Abbildung 3: Aufbau dieser Arbeit.....	26
Abbildung 4: Allgemeiner Versuchsaufbau.....	28
Abbildung 5: Das Tg4-42-Transgen.....	29
Abbildung 6: Tierhaltungsbedingungen im Vergleich.....	31
Abbildung 7: Zählregeln.....	38
Abbildung 8: Versuchsaufbau <i>String Suspension Test</i>	39
Abbildung 9: Versuchsaufbau <i>Balance Beam Test</i>	41
Abbildung 10: Versuchsaufbau MWM, <i>Cued Training</i> . Draufsicht und perspektivische Darstellung.....	43
Abbildung 11: Versuchsaufbau MWM, <i>Acquisition Training</i>	45
Abbildung 12: Versuchsaufbau MWM, <i>Probe Trial</i>	46
Abbildung 13: Versuchsaufbau <i>Cross Maze Test</i> , Draufsicht (A) und perspektivische Darstellung (B).....	48
Abbildung 14: Beispiel für Nachweis von A β 4-42 mittels Gelelektrophorese.....	52
Abbildung 15: Entwicklungen des motorischen Phänotyps im Altersverlauf.....	54
Abbildung 16: Einfluss von EE auf den motorischen Phänotyp.....	55
Abbildung 17: <i>Cued Training</i> im Altersverlauf.....	56
Abbildung 18: <i>Acquisition Training</i> im Altersverlauf.....	57
Abbildung 19: Entwicklung der räumlichen Gedächtnisleistung im <i>Probe Trial</i>	58
Abbildung 20: Auswirkungen von EE auf das <i>Cued Training</i>	59
Abbildung 21: Auswirkungen von EE auf das <i>Acquisition Training</i>	60
Abbildung 22: Einfluss von EE auf räumliche Gedächtnisleistung im <i>Probe Trial</i>	61
Abbildung 23: <i>Cross Maze Test</i> ; Entwicklungen im Altersverlauf und Einfluss von EE.	63
Abbildung 24: Entwicklung der Neuronenzahl in CA1 und Einfluss durch EE.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Protokoll.....	33
Tabelle 2: Erläuterungen	37
Tabelle 3: Stereologieparameter	38
Tabelle 4: Bewertung der Halte- und Kletterbewegung im <i>String Suspension Test</i>	40
Tabelle 5: Start- und Zielpositionen im <i>Cued Training</i>	43
Tabelle 6: Start- und Zielposition im <i>Acquisition Training</i>	45
Tabelle 7: Startposition im <i>Probe Trial</i>	46
Tabelle 8: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	49
Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien	50
Tabelle 10: Verwendete Software	51

Abkürzungsverzeichnis

A β	Beta-Amyloid
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i> , eine Disintegrin- und Metalloprotease
AICD	<i>APP intracellular domain</i> , intrazelluläre Domäne des APP
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid precursor protein</i> , Amyloid-Vorläuferprotein
BACE	<i>β-site of APP cleaving enzyme</i>
bp	Basenpaare
CDT	<i>clock drawing test</i> , Uhrentest
CT	Computertomographie
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
EE	<i>Enriched Environment</i>
EOFAD	<i>early onset familial Alzheimer's disease</i>
FAD	Familiäre Alzheimerdemenz
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society of Laboratory Animal Science
MCI	<i>mild cognitive impairment</i> , leichte kognitive Beeinträchtigung
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MRT	Magnetresonanztomographie
MWM	<i>Morris Water Maze Test</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
nAChR	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PiB	<i>Pittsburgh compound B</i>

PS-1 / PS-2	Präsenilin-1 / Präsenilin-2
pTau	Phosphoryliertes Tau
sAPP α/β	<i>soluble ectodomain of APPα/β</i>
SH	Standardhaltung
Tg4-42 _{hom}	homozygote Mäuse des Typs Tg4-42
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WT	Wildtyp
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung der UMG

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

Seit ihrer Erstbeschreibung durch den deutschen Arzt Alois Alzheimer vor mehr als einem Jahrhundert (Alzheimer 1907) ist die gleichnamige Alzheimer-Krankheit (auch Morbus Alzheimer/*M. Alzheimer*) Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Trotz zahlreicher wichtiger Entdeckungen liegen noch viele Aspekte besonders im Bereich der Prävention und Therapie im Dunkeln. Dies ist insofern von großer Bedeutung, als *M. Alzheimer* in der heutigen Zeit des medizinischen Fortschritts und der damit verbundenen steigenden Lebenserwartung und Zunahme an Demenzerkrankungen eine wichtige medizinische Herausforderung für die Zukunft darstellt (Milan und Fetzer 2019).

1.2 Epidemiologische Daten

Im Jahre 2019 litten schätzungsweise weltweit über 50 Millionen Menschen an einer demenziellen Erkrankung (Lynch 2020). In Deutschland betrug die Zahl der Demenzkranken in diesem Jahr nach Berechnungen der Deutschen Alzheimer Gesellschaft 1,6 Millionen, davon mehr als 300 000 Neuerkrankungen p.a. (Deutsche Alzheimer Gesellschaft 2020). Mit einem Anteil von ca. 60 bis 80 Prozent stellt die Alzheimer-Krankheit die Hauptursache für Demenzen dar (Alzheimer's Association 2016; Barker et al. 2002). Nach einer Analyse der Kohorte aus der Framingham-Studie lag die durchschnittliche Prävalenz bei 0,01 für Männer bzw. 0,03 für Frauen (Bachman et al. 1992). Nach heutigen Schätzungen der Bevölkerungsentwicklung wird sich die Anzahl der an *M. Alzheimer* erkrankten Menschen bis zum Jahre 2050 nahezu verdreifachen, sollte kein nennenswerter Fortschritt in Prävention und Behandlung gelingen (Hebert et al. 2003; Hebert et al. 2013).

1.3 Risikofaktoren

1.3.1 Nicht-genetische Risikofaktoren

Einige der Risikofaktoren für *M. Alzheimer*, die keinen Zusammenhang mit dem genetischen Phänotyp des Patienten haben, sind ebenfalls für die vaskuläre Gesundheit von Bedeutung. So ist Arteriosklerose besonders der Hirngefäße mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, an

M. Alzheimer zu erkranken, verbunden (Yarchoan et al. 2012). Auch zurückliegende Schlaganfälle erhöhen das Erkrankungsrisiko und können sogar das Alter, in dem die Krankheit eintritt, im Vergleich zum Bevölkerungsdurchschnitt senken (Honig et al. 2003). Neben den direkten Schäden an Gefäßen und Störungen der Organdurchblutung sind auch andere vaskuläre Risikofaktoren, die z. B. eine Arteriosklerose zur Folge haben können, eng mit M. Alzheimer verknüpft. So tragen z. B. eine arterielle Hypertonie oder Rauchen zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko bei (Prince et al. 1994; Livingston et al. 2017; Livingston et al. 2020). Auch Patienten, die an Diabetes mellitus Typ 2 leiden, stellen eine Risikogruppe für M. Alzheimer dar (Ott et al. 1999; Cheng et al. 2011). Von Bedeutung ist des Weiteren auch die Konzentration der Blutfette. Eine Hyperlipidämie und eine erhöhte Cholesterinkonzentration im Blut sind auch hier mit einem gesteigerten Risiko verbunden (Kivipelto und Solomon 2006). All diese teilweise potenziell reversiblen Einflussgrößen verstärken sich gegenseitig. Bei einer Anhäufung der einzelnen Risikofaktoren kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Risikos, an M. Alzheimer zu erkranken, wobei Rauchen und Diabetes mellitus Typ 2 der größte Einfluss zugerechnet werden (Luchsinger et al. 2005).

Ebenfalls sind traumatische Hirnverletzungen mit einem früheren Eintrittsalter der Alzheimer-Krankheit verbunden (LoBue et al. 2016). Auch Depressionen und Schlafstörungen erhöhen das Risiko sowohl für eine leichte kognitive Beeinträchtigung als auch für eine Demenz vom Alzheimer-Typ (Jacob et al. 2016; Burke et al. 2016).

Einen nicht beeinflussbaren Faktor stellt das Geschlecht dar. Frauen zeigen im Vergleich zu Männern eine erhöhte Prävalenz für die Alzheimer-Krankheit (Bachman et al. 1992). Die weitere wichtige nicht beeinflussbare Größe ist das Alter. Von den 5,4 Millionen in den USA an Alzheimer erkrankten Menschen sind 5,2 Millionen 65 Jahre oder älter (Alzheimer's Association 2016). Ebenso nimmt die Prävalenz von Demenz im Allgemeinen und M. Alzheimer im Besonderen exponentiell im Alter zu (Prencipe et al. 1996). So steht in Europa im Zeitraum von 1980 bis 1990 eine Prävalenz im Alter zwischen 60 und 69 Jahren von 0,3 einer Prävalenz von 3,2 bzw. 10,8 für die Altersgruppen der 70- bis 79-jährigen bzw. der 80 bis 89-jährigen gegenüber (Rocca et al. 1991). Somit ist das Alter der größte nicht-genetische Risikofaktor für eine Alzheimer-Erkrankung.

1.3.2 Genetische Risikofaktoren

Im Laufe der Jahre konnte die Forschung zahlreiche genetisch bedingte Risikofaktoren für M. Alzheimer identifizieren. Die wichtigsten Ursachen für die familiäre Form mit früher Erstmanifestation (EOFAD, *early onset familial Alzheimer's disease*) stellen Mutationen im *APP*-

Gen und in den Genen *PSEN1* und *PSEN2* dar, die für die Proteine Präsenilin-1 bzw. Präsenilin-2 kodieren (Goate et al. 1991). Infolge von Punktmutationen in bestimmten Bereichen des *APP*-Gens kommt es zu einer Überproduktion von β -Amyloid (Citron et al. 1992; Suzuki et al. 1994). Auch Präsenilin-1 und -2 (PS-1 bzw. -2) sind als Teil des γ -Sekretase-Komplexes an der Prozessierung des APP zu Amyloid- β ($A\beta$) beteiligt. Mutationen in denen für diese beiden Transmembranproteine kodierenden Genen können zu einer relativen Erhöhung der Spiegel von $A\beta_{1-42}$ führen, das im Vergleich zu $A\beta_{1-40}$ schneller Plaques formen kann (Schellenberg et al. 1992; Levy-Lahad et al. 1995). Da sich das *APP*-Gen auf Chromosom 21 befindet, geht mit der Trisomie 21 ebenfalls ein genetisch erhöhtes Risiko einher, da es hierbei zu einer Überexpression des Gens und somit zu einer Überproduktion von APP kommt, das im Verlauf weiter zu $A\beta$ gespalten wird (Zheng und Koo 2011).

Ein weiterer genetischer Risikofaktor für M. Alzheimer ist eine Isoform des Strukturproteins Apolipoprotein E auf Chromosom 19, dem Apolipoprotein Epsilon 4 (ApoE4). Träger des ApoE4-Allels sind im Gegensatz zu Nicht-Betroffenen einem beachtlich höheren Risiko für sporadischen und familiären M. Alzheimer ausgesetzt. Corder et al. (1993) berichten von einer Risikosteigerung von 20 auf nahezu 90 Prozent. Zudem korreliert eine erhöhte Anzahl der ApoE4-Allele ebenfalls mit einem früheren Beginn der Krankheit. Während ApoE4 also das Risiko, an M. Alzheimer zu erkranken, erhöht, so ist der Typ 2 des ApoE mit einem geringeren relativen Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer-Krankheit assoziiert (Serrano-Pozo et al. 2015). Ein geringer Plasmaspiegel von ApoE, egal welchen Typs, ist hingegen mit einem erhöhten Risiko für Alzheimer und Demenz verbunden (Rasmussen et al. 2015).

Diese Beispiele für genetische Ursachen des M. Alzheimer sind schon einige Jahrzehnte bekannt. In jüngster Zeit konnten noch andere identifiziert werden, die vermutlich in der Entstehung von einigen Formen des M. Alzheimer beteiligt sind. So konnte für einige Varianten des *CLU*-Gens, das für das Protein Clusterin kodiert, eine Verbindung mit M. Alzheimer gezeigt werden (Harold et al. 2009). Auch korrelierten bei Alzheimer-Patienten die Clusterin-Konzentration im Plasma mit der Schwere der Krankheit (Thambisetty et al. 2010). Ein weiteres Beispiel ist das *SORL1*-Gen (*sortilin related receptor*). *SORL1* ist an der Prozessierung von APP beteiligt und führt letztendlich zu einer Reduktion der Produktion von $A\beta$. Bei an M. Alzheimer erkrankten Patienten konnte eine verminderte Expression von *SORL1* festgestellt werden (Rogaeva et al. 2007). Mutationen im *TREM2*-Gen sind ebenfalls mit einem erhöhten Alzheimer-Risiko verbunden, wobei hier mehr Varianten im Exon 2 vorlagen (Jonsson et al. 2013; Guerreiro et al. 2013).

1.4 Klinischer Verlauf und Symptome

Wie die meisten Demenzformen entwickelt sich M. Alzheimer zunächst unerkannt und lässt sich in seinem Verlauf in mehrere Abschnitte einteilen. Die S3-Leitlinie „Demenzen“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) und der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) nennen hierzu die Kriterien des National Institute on Aging und der Alzheimer's Association (NIA-AA) sowie die Kriterien der International Working Group (IWG). Im Falle der Alzheimer-Krankheit legen die NIA-AA-Kriterien drei Stadien fest: das präklinische Stadium, das Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung (mild cognitive impairment, MCI), sowie das Stadium der Alzheimer-Demenz (Khachaturian 2011; Jack et al. 2011). Im präklinischen Stadium zeigen betroffene Patienten keinerlei Symptome. In den Gehirnen ist es jedoch schon zu pathologischen Veränderungen gekommen, was sich auch häufig durch die Messung verschiedener Biomarker nachweisen lässt (Sperling et al. 2011; Price und Morris 1999). Dieser Zeitabschnitt beginnt oft Jahre bzw. Jahrzehnte, bevor die Diagnose einer Demenz gestellt wird (Morris 2005). Im Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung kommt es zu ersten auffälligen Symptomen, die sich im alltäglichen Leben bemerkbar machen (Petersen 2004). Hierzu zählen sowohl Vergesslichkeit und eine Abnahme des Erinnerungsvermögens als auch von Aufmerksamkeit, Sprache und der visuellen Raumvorstellung. Trotzdem behalten Patienten in diesem Stadium noch weitestgehend ihre Unabhängigkeit im Alltag (Albert et al. 2011). In 10 bis 15 % der Fälle pro Jahr kommt es zu einem Übergang einer leichten kognitiven Beeinträchtigung in das Stadium der Demenz, die eigentliche Alzheimer-Krankheit (Petersen et al. 1999). Es kommt zur Verstärkung von bereits vorhandenen sowie zur Entwicklung von neuen Symptomen, z. B. Persönlichkeitsänderungen wie Apathie, Verlust von Empathie oder compulsiven und obsessiven Verhaltensweisen (McKhann et al. 2011). Hat sich die Demenz voll entwickelt, so sind die Patienten in der Bewältigung des Alltags häufig komplett auf fremde Unterstützung durch Angehörige oder Pflegepersonal angewiesen. Meist versterben die Patienten an begleitenden Infektionen, wobei hier vor allem Pneumonien eine besondere Bedeutung zukommt (Wada et al. 2001). Die Einteilung der IWG ist der der NIA-AA sehr ähnlich. Hier wird jedoch auf das Stadium der Demenz als eigentliche Alzheimer-Entität verzichtet und bereits das präklinische Stadium sowie die leichte kognitive Beeinträchtigung der Alzheimer-Krankheit zugeordnet (Dubois et al. 2014).

Der Übergang der einzelnen Stadien ineinander verläuft häufig graduell, weswegen die exakte individuelle Einordnung häufig nicht eindeutig möglich ist. Der Übergang einer leichten kognitiven Beeinträchtigung in eine Demenz misst sich im Allgemeinen daran, ob aufgrund

der Symptome die Fähigkeit im Alltag oder Berufsleben zurechtzukommen signifikant beeinträchtigt ist (McKhann et al. 2011).

1.5 Diagnostik

Aufgrund der Tatsache, dass es lange vor dem Auftreten von Auffälligkeiten zu einer Abnahme der kognitiven Fähigkeiten kommt, ist eine frühe Diagnose von M. Alzheimer schwierig (Wilson et al. 2012). Es existieren jedoch einige kurze und schnelle Tests, mit denen sich die kognitiven Leistungen der Patienten abschätzen lassen und ein grobes Screening auf eine demenzielle Entwicklung erfolgen kann. Im klinischen Alltag finden neben einigen anderen beispielsweise der Mini-Mental-Status-Test (MMST) und der Uhrentest (*clock drawing test*; CDT) Anwendung (Olazarán et al. 2016). Beim MMST muss der Patient elf vom Untersucher vorgegebene Aufgaben erfüllen, die bei korrekter Ausführung mit Punkten bewertet werden. Anhand der Gesamtpunktzahl kann die Abschätzung von Konzentration, Orientierung, Gedächtnis, Sprache und Motorik erfolgen (Folstein et al. 1975). Trotz gewisser Einschränkungen ist der MMST die am häufigsten genutzte Screening-Methode zum Ausschluss einer Demenz. Der Uhrentest, bei dem die Aufgabe darin besteht, das Ziffernblatt einer Uhr möglichst genau aufzuzeichnen ist ebenfalls zum schnellen Abschätzen kognitiver Einschränkungen z. B. aufgrund von frühen Alzheimerformen und in Kombination mit dem MMST sogar begrenzt zur Differenzierung von Demenzursachen geeignet (Manos und Wu 1994; Moretti et al. 2002).

Eine weitere Möglichkeit im Rahmen der Alzheimer Diagnostik besteht in der Untersuchung des durch Lumbalpunktion gewonnenen Liquors. Hierbei wird der Schwerpunkt vor allem auf die Konzentrationen von Tau-Protein und β -Amyloid ($A\beta$) gelegt. Im Rahmen der Alzheimer-Krankheit finden sich hier erniedrigte Werte für $A\beta$ und erhöhte Werte für Tau. Diese Kombination spiegelt die Amyloid-Ablagerungen im Extrazellularraum und die intrazellulären Neurofibrillenbündel wider und eignet sich zur Diagnose von beginnenden Veränderungen im Gehirn (Tapiola et al. 2009; Seppala et al. 2012). Im Bereich des Tau-Proteins lässt sich noch genauer zwischen der Konzentration des Gesamt-Tau und des phosphorylierten Tau (pTau) unterscheiden, deren jeweilige Konzentrationen Rückschlüsse auf den Grad der neuronalen Schädigung bzw. die Bildung von Neurofibrillenbündeln erlauben (Hesse et al. 2001).

Bildgebende Verfahren wie CT und MRT kommen ebenfalls regelmäßig zum Einsatz, häufig mit dem Zweck des Ausschlusses einer reversiblen Ursache (z. B. Normaldruckhydrozephalus, Hämatom oder Tumor) oder der Differenzialdiagnostik einer

demenziellen Entwicklung (Hejl et al. 2002; Scheltens et al. 2002). In fortgeschrittenen Krankheitsstadien lässt sich auch eine Abnahme des Hirnvolumens mit Vergrößerung der Liquorräume darstellen, was sich ebenfalls zur Verlaufskontrolle eignet (Frisoni et al. 2010). Im Bereich der funktionellen Bildgebung finden bei der Alzheimerdiagnostik vorwiegend die beiden Verfahren FDG-PET sowie PiB-PET Anwendung. Bei der FDG-PET wird mithilfe des Radiopharmakons ^{18}F -2-Fluor-2-desoxy-D-Glukose die Stoffwechselaktivität des Gehirns dargestellt. Die FDG-PET eignet sich durch die Darstellung der bei M. Alzheimer veränderten metabolischen Struktur des Gehirns als diagnostisches Instrument bereits zum Erkennen des Übergangs vom normalen Altern zu einer milden Alzheimer-Demenz (Pagani et al. 2016). Beim PiB-PET wird das Radiopharmakon Pittsburgh Compound B (2-(4'-[^{11}C]Methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazol) verwendet. Es eignet sich zur Darstellung von A β -Ablagerungen, da es vor allem in Bereichen des Gehirns aufgenommen wird, die eine hohe Konzentration von A β -Plaques enthalten (Cohen und Klunk 2014).

Eine sichere Diagnose des M. Alzheimer kann erst nach dem Tode des Patienten anhand von Hirnschnitten und neuropathologischen Untersuchungen gestellt werden.

1.6 Neuropathologische Charakteristika

1.6.1 Amyloid-Ablagerungen

Bereits in der Erstbeschreibung der später nach ihm benannten Krankheit berichtete der deutsche Psychiater Alois Alzheimer über charakteristische histologische Veränderungen in Hirnschnitten seiner verstorbenen Patientin Auguste Deter. Diese Veränderungen stellten sich als extrazelluläre Ablagerungen dar (Alzheimer 1907). Hauptbestandteil dieser Ablagerungen, auch Plaques genannt, sind Peptide des Typs Amyloid- β (A β ; (Glennner und Wong 1984). A β -Peptide entstehen physiologisch im menschlichen Organismus durch Schneiden des *amyloid precursor protein*, (Amyloid-Vorläuferprotein, APP) mittels der β - und γ -Sekretase (De Strooper et al. 2010).

Die Amyloid-Ablagerungen können in zwei Unterarten aufgeteilt werden, die sich anhand ihres Anfärbeverhaltens und ihres Aufbaus unterscheiden: Die diffusen Plaques und die neuritischen Plaques. Neuritische Plaques bestehen aus einem dichten Kern von fibrillärem β -Amyloid. Aufgrund ihres Aufbaus in β -Faltblatt-Struktur lassen sie sich gut mit Thioflavin-S anfärben (Schmidt et al. 1995). Im Umkreis dieser dichten Ablagerungen finden sich typischerweise dystrophe Neuriten, sowie aktivierte Astrozyten und Mikroglia (Itagaki et al. 1989; Pike et al. 1995a). Neuritische Plaques sind zusätzlich mit einem Verlust an Synapsen

verbunden (Serrano-Pozo et al. 2011). Weitere Bestandteile von neuritischen Plaques sind u. a. Tau und APP (Cras et al. 1991; Su et al. 1993). Nach Thal et al. erfolgt die Ausbreitung der Plaques von isokortikal über allokortikal/limbisch nach subkortikal (Thal et al. 2002). Diffuse Plaques können neben Alzheimer-Patienten auch in den Gehirnen älterer Menschen, die keine abnormen kognitiven Einschränkungen aufweisen, nachgewiesen werden (Serrano-Pozo et al. 2011). Sie bestehen aus nicht-fibrillären A β . Ihre Größe variiert stark mit Durchmessern von unter 10 μm bis über 200 μm (Joachim et al. 1989). Im Gegensatz zu neuritischen Plaques führen diffuse Plaques nicht zu einem Synapsenverlust und lassen das Neuropil weitestgehend intakt (Yamaguchi et al. 1989; Masliah et al. 1990).

1.6.2 Neurofibrillenbündel

Ein weiteres Charakteristikum der Alzheimer-Krankheit sind Einlagerungen in Neuronen, die sogenannten Neurofibrillenbündel. Grundbaustein dieser intrazellulären Ablagerungen ist das Tau-Protein (Wischik et al. 1988; Goedert et al. 1988). Das Tau-Protein liegt in mehreren Isoformen vor, deren Ursprungsgen sich auf Chromosom 17 befindet (Goedert et al. 1989). Tau-Proteine besitzen Bindungsstellen für Mikrotubuli und sind unter anderem für deren Stabilität von Bedeutung (Butner 1991). Beim Menschen kommt Tau vorwiegend in Neuronen, aber auch in anderen Zellen wie Oligodendrozyten oder Astrozyten vor (Dehmelt und Halpain 2005). Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung wird dieses Protein abnormal phosphoryliert und hyperphosphoryliert, wodurch es in der Folge zu unlöslichen Ablagerungen innerhalb von Neuronen und Gliazellen kommt (Bramblett et al. 1993; Khatoon et al. 1994). Heutzutage geht man davon aus, dass die abnormale Phosphorylierung und die Anreicherung der Zellen mit Tau-Protein lange vor dem Auftreten von Symptomen beginnt (Bateman et al. 2012). Zu Beginn des M. Alzheimer kommt es zu Tau-Ablagerungen in Zellen der Area entorhinalis und des Hippocampus. Im weiteren Krankheitsverlauf breiten sich die Einschlüsse in den okzipitotemporalen Kortex und die Inselrinde aus. Im letzten Stadium finden sich Ablagerungen von Tau-Protein in der gesamten Hirnrinde (Braak und Braak 1999). Aktuelle Forschungsarbeiten mit *in vivo*-Versuchen an transgenen Mäusen deuten darauf hin, dass die Verbreitung der Proteineinschlüsse innerhalb des Gehirns über anatomisch verbundene Gebiete erfolgt und sich prionenähnlich verhält (Ahmed et al. 2014; Sanders et al. 2014). Neben M. Alzheimer gibt es noch mehrere andere Erkrankungen, bei denen es zu pathologischen intrazellulären Ablagerungen von Tau-Proteinen kommt. Als Beispiele für diese sogenannten Tauopathien seien hier die frontotemporale Demenz, die progressive supranukleäre Blickparese und die kortikobasale Degeneration genannt (Arendt et al. 2016).

1.6.3 Kortikale Atrophie und Nervenzellverlust

Im Rahmen der Alzheimer-Krankheit kommt es zu einer kortikalen Atrophie, deren typisches Verteilungsmuster sich u. a. auf die Hippocampi, die Temporal- und Parietallappen und die Area entorhinalis erstreckt (Jack et al. 1992; Killiany et al. 1993; Juottonen et al. 1998). Der Volumenverlust in den einzelnen Hirnarealen lässt sich im fortgeschrittenen Stadium magnetresonanztomographisch darstellen und somit ein M. Alzheimer mit hoher Wahrscheinlichkeit diagnostizieren (Norfray und Provenzale 2004). Die oben beschriebene kortikale Atrophie ist Ausdruck eines Untergangs an Neuronen in den betroffenen Gebieten, ein weiteres wichtiges histopathologisches Charakteristikum des M. Alzheimer (Serrano-Pozo et al. 2011). Der Nervenzellverlust korreliert dabei teilweise mit der Anzahl an Neurofibrillenbündel und übersteigt diese sogar, sodass er sich besser mit dem Ausmaß der kognitiven Einschränkungen betroffener Patienten verbinden lässt (Gomez-Isla et al. 1997). Häufig sind die Area entorhinalis, die Regionen CA1 und CA3 des Hippocampus sowie die Parietal- und Temporalrinde betroffen (West et al. 1994; Giannakopoulos et al. 1996; Zhang et al. 2009; Serrano-Pozo et al. 2011). Als eine weitere Ursache für den Untergang an Neuronen wird die neurotoxische Wirkung von intrazellulärem A β diskutiert (Bayer und Wirths 2010). In normal alternden Gehirnen lässt sich im Gegensatz zu Gehirnen von Alzheimer-Patienten kein nennenswerter Nervenzellverlust nachweisen (Morrison und Hof 1997). Neben einem Verlust an Nervenzellen kommt es bei der Alzheimer-Erkrankung auch zu einem Untergang von Synapsen (Davies et al. 1987). Bereits in frühen Stadien der Alzheimer-Krankheit kommt es zu einer Abnahme der Synapsendichte (Masliah et al. 2001; Scheff et al. 2006). Das Ausmaß des Synapsenuntergangs zeigt einen starken Zusammenhang mit kognitiven Einschränkungen und korreliert mit ihnen sogar noch besser als der Neuronenverlust (DeKosky und Scheff 1990; Terry et al. 1991).

1.7 Pathogenese des M. Alzheimer

1.7.1 Das *amyloid precursor protein*

Das *amyloid precursor protein* (Amyloid-Vorläuferprotein, APP) ist ein Typ-1-Transmembranprotein. Es besitzt eine kleine intrazelluläre Domäne am C-Terminus, eine A β -Peptid-Region sowie eine große extrazelluläre Domäne am N-Terminus (Kang et al. 1987). APP ist Mitglied einer Peptidfamilie, zu denen bei Säugetieren auch das *amyloid precursor-like protein 1* (APLP1) und 2 (APLP2) gehören (Coulson et al. 2000; Wasco et al. 1992). Die A β -Peptid-Region findet sich jedoch nur bei APP (Zheng und Koo 2011). Beim Menschen befindet sich das Gen für *APP* auf Chromosom 21 (Lamb et al. 1993; Zheng und

Koo 2011). APP existiert in verschiedenen Isoformen und wird in einer Vielzahl von Gewebetypen exprimiert, wobei sich die Isoform APP695 vor allem in Neuronen findet (Nhan et al. 2015). Die Funktion von APP ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht endgültig geklärt. So wird APP zum Beispiel die Funktion eines Oberflächenrezeptors ähnlich dem Notch-Rezeptor zugesprochen (Selkoe und Kopan 2003). Als möglicher Ligand wird A β postuliert (Lorenzo et al. 2000). Neben der Synaptogenese scheint APP auch u. a. bei der Ausbildung von Zellverbänden, dem Wachstum von Neuriten und dem Transport von Proteinen innerhalb der Zelle beteiligt zu sein (Moya et al. 1994; Zheng und Koo 2011). Ebenso werden APP auch neurodegenerative Funktionen zugewiesen (Nhan et al. 2015).

Auch im Hinblick auf die Alzheimer-Krankheit spielt APP eine entscheidende Rolle, da der Hauptbestandteil von Amyloid-Plaques, wie oben beschrieben eines der Charakteristika von M. Alzheimer, durch Proteolyse von APP entsteht. Die weitere Prozessierung und proteolytische Spaltung von APP wird durch verschiedene Sekretasen vorgenommen (α -, β -, und γ -Sekretasen). Je nach beteiligter Sekretase und der damit korrespondierenden Spaltungsstelle werden verschiedenen Wege der Proteolyse eingeschlagen, an deren Ende verschiedene Endprodukte stehen. Zwei dieser Wege, der nicht-amyloidogene und der amyloidogene Weg werden im Folgenden kurz beschrieben.

1.7.1.1 Nicht-amyloidogener und amyloidogener Weg

Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP zunächst durch α -Sekretase gespalten. Es existiert nicht eine bestimmte α -Sekretase sondern verschiedenen Mitglieder der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloprotease*) übernehmen diese Aufgabe (Lichtenthaler 2011, Nhan et al. 2015). Nach Spaltung durch α -Sekretase entstehen die lösliche Ektodomäne sAPP α (*soluble ectodomain of APP*) und das intrazelluläres C-terminales Fragment C83 (De Strooper 2010). C83 wird durch eine γ -Sekretase weiter zu dem löslichen C-terminalen Fragment p3 und der APP *intracellular domain* (AICD) geschnitten. Da die Spaltung durch α -Sekretase innerhalb des A β -Abschnitts von APP geschieht, entsteht hierbei keine β -Amyloide in voller Länge (Zheng und Koo 2011).

Im amyloidogenen Weg wird APP durch die β -Sekretase BACE1 gespalten (Hussain et al. 1999; Vassar et al. 1999) und es entstehen ein kürzeres lösliches APP-Fragment (sAPP β) und ein dementsprechend längeres C-terminales Fragment C99 (Nhan et al. 2015; Biernaskie und Corbett 2001). C99 wird anschließend durch eine γ -Sekretase zu AICD und A β geschnitten. Die γ -Sekretase kann C99 an verschiedenen Stellen schneiden, sodass verschieden lange A β -Peptide entstehen können (De Strooper et al. 1998). Die im Gesunden am häufigsten vorliegenden A β -Peptide enden an Val-40 bzw. Ala-42 und heißen dementsprechend A β 40

und A β 42 (De Strooper et al. 1998; De Strooper 2010), wobei A β 42 im Vergleich zu A β 40 in deutlich geringerem Ausmaß vorliegt (Zheng und Koo 2011).

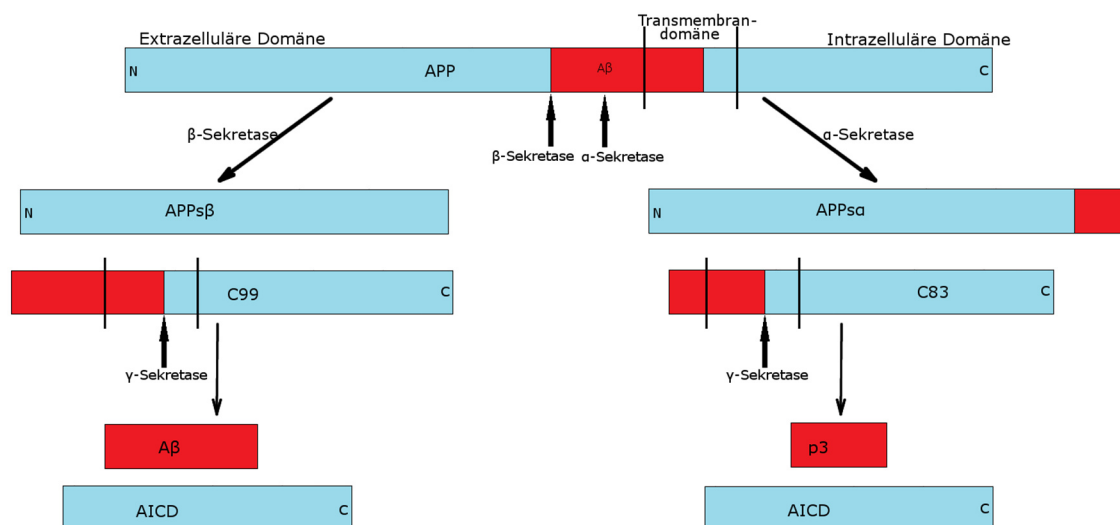


Abbildung 1: Spaltung des amyloid precursor proteins (APP). Vereinfachte Darstellung der Spaltung von APP über den nicht-amyloidogenen Weg (rechts) und den amyloidogenen Weg (links). Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP zunächst durch eine α -Sekretase innerhalb des A β -Abschnitts zur löslichen Ektodomäne sAPP α und dem intrazellulären C-terminalen Fragment C83 gespalten. Die γ -Sekretase schneidet dann C83 weiter zum löslichen C-terminalen Fragment p3 und der APP intracellular domain (AICD). Im amyloidogenen Weg schneidet zunächst die β -Sekretase APP in das C-terminale Fragment C99 sowie die lösliche Ektodomäne sAPP β . Anschließend wird C99 durch γ -Sekretase zu AICD und A β gespalten. Da die γ -Sekretase C99 an verschiedenen Stellen schneiden kann, sind A β -Peptide unterschiedlicher Länge möglich. Zur besseren Anschaulichkeit ist hier nur eine Spaltungsstelle eingezeichnet.

1.7.2 Amyloid-Hypothese

Die Amyloid-Hypothese, die vor über 20 Jahren aufgestellt wurde, stellt die wohl grundlegendste Annahme im Hinblick auf die Erklärung der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit dar. Gemäß dieser Hypothese werden die extrazellulären Ablagerungen von A β als ursprüngliche Ursache der Alzheimer-Krankheit angesehen, die weitere pathologische Prozesse, wie zum Beispiel den Untergang von Neuronen und Synapsen oder die Bildung von Neurofibrillenbündeln, nach sich ziehen (Hardy und Allsop 1991). Die Überlegung, dass Amyloidablagerungen eine wichtige Rolle in der Pathologie der Alzheimer-Erkrankung spielen, existiert schon seit der Identifizierung von A β als Hauptkomponente der extrazellulären Plaques (Glennner und Wong 1984; Masters et al. 1985). Mehrere Beobachtungen stützen diese Theorie. Der wichtigste dieser These untermauernde Faktor ist sicherlich der genetische Hintergrund der Patienten, die an der familiären Frühform der

Alzheimer-Krankheit leiden. So führt der Großteil der Mutationen, die für die Entwicklung der familiären Alzheimerform verantwortlich sind, z. B. Mutationen am *APP*-Gen oder den Präsenilinen, zu einer Erhöhung von A β 42, einer unlöslichen Form des Amyloid- β Peptids (Tanzi und Bertram 2005). An Down-Syndrom erkrankte Patienten können schon in jungen Jahren an einer Alzheimer-Demenz (AD) erkranken, da sich das *APP*-Gen auf Chromosom 21 befindet und es so zu einer verstärkten Bildung von A β und Amyloidplaques kommt (Beyreuther et al. 1993). Einer der wichtigsten Risikofaktoren des M. Alzheimer, ApoE ϵ 4, geht mit erhöhter Ablagerung und vermindertem Abbau von A β einher (Selkoe und Hardy 2016). Des Weiteren zeigen zahlreiche transgene Mausmodelle, die auf Mutationen der familiären Alzheimerdemenz (FAD) beruhen, altersabhängige Pathologien, die denen menschlicher Patienten stark ähneln, u. a. Gliose, A β -Plaques, sowie kognitive Einschränkungen (Duyckaerts et al. 2008).

1.7.3 Modifizierte Amyloid-Hypothese

Lange Zeit galten die extrazellulären Amyloidablagerungen im Gehirn als die für die Ätiologie der Alzheimer-Krankheit hauptverantwortliche Pathologie. Trotz einer weitreichenden und allgemeinen Akzeptanz, die die Amyloid-Hypothese über die Jahre erfahren hat, existieren einige Sachverhalte, die sich nicht mit diesem Modell in Einklang bringen lassen. So lassen sich z. B. mittels PiB-PET auch in den Gehirnen von normal gealterten Populationen Amyloidablagerungen nachweisen, ohne dass sich eine signifikante kognitive Einschränkung daraus ergeben hätte (Aizenstein et al. 2008). Weitere Studien mit PiB-PET zeigten keine direkte Korrelation der Menge der extrazellulären Amyloidplaques mit dem Ausmaß des Verlusts an kognitiven Fähigkeiten, sondern konnten diesen eher der Neurodegeneration zuordnen. (Engler et al. 2006; Jack et al. 2009). Auch die Menge der Neurofibrillenbündel korreliert besser mit den kognitiven Einschränkungen als das Ausmaß der Amyloidablagerungen (Arnold et al. 1991; Braak und Braak 1991).

Bei Patienten mit Down-Syndrom kommt es bereits vor einer extrazellulären Plaquebildung zu einer intrazellulären Akkumulation von A β (Mori et al. 2002). Auch bei verschiedenen murinen Alzheimermodellen konnte diese zeitliche Abfolge nachgewiesen werden (Wirhth et al. 2001; Blanchard et al. 2003). Zusätzlich kommt es schon vor der Amyloidablagerung zu einer Entzündungsreaktionen und einem Untergang von Neuronen im Gehirn (Wright et al. 2013).

Aufgrund dieser und weiterer Gegebenheiten wurde das Modell der Amyloid-Hypothese modifiziert. Diese Hypothese besagt im Kern, dass für den Neuronenverlust und damit die

kognitive Degeneration anstatt wie bisher angenommen der extrazellulären Amyloidplaques vielmehr das intrazelluläre β -Amyloid verantwortlich ist (Bayer und Wirths 2010). Das intraneuronal angesammelte $A\beta$ hat dabei seinen Ursprung aus zwei verschiedenen Mechanismen. Ein Teil wird in der Zelle selbst durch Spaltung von APP hergestellt, der andere Teil stammt aus der Wiederaufnahme des bereits im Extrazellularraum vorhandenen $A\beta$ (Wirths et al. 2004; Guerreiro et al. 2013). Bislang wurden zahlreiche Rezeptorklassen vorgeschlagen, die bei der Wiederaufnahme von $A\beta$ eine Rolle spielen, u. a. ApoE-Rezeptoren, nikotinsche Acetylcholinrezeptoren (nAChR), N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), bestimmte Integrine und sog. Rezeptoren für AGE (*advanced glycation endproducts*). $A\beta_{42}$ wird nur schlecht abgebaut und die Anreicherung im Inneren von Nervenzellen hat eine Vielzahl von negativen Effekten zur Folge, die abhängig von der Lokalisation der $A\beta$ -Ablagerung im Intrazellularraum und den Organellen sind (Mohamed und Posse de Chaves 2011). So führen z. B. Ablagerungen von $A\beta$ in Lysosomen zu einem Verlust der lysosomalen Permeabilität und zudem zu Austritt von Cathepsinen und Proteasen, was wiederum zu Untergang der Zelle führt (Ditaranto et al. 2001; Liu et al. 2010). Eine Akkumulation in späten Endosomen (sog. Multivesikulären Körperchen) kann deren Lokalisation beeinträchtigen und pathologische Auswirkungen auf deren Abbaufunktion haben (Takahashi et al. 2002; Mohamed und Posse de Chaves 2011). Ebenso bestehen Zusammenhänge zwischen intrazellulärem $A\beta$ und Apoptosemarkern in Tiermodellen für M. Alzheimer und humanen Patienten (Chui et al. 2001; Mohamed und Posse de Chaves 2011). Die hier aufgeführten Entdeckungen deuten in der Zusammenschau darauf hin, dass intrazelluläres $A\beta$ eine entscheidende Rolle beim Morbus Alzheimer, sowohl in der Entstehung als auch im Voranschreiten der Krankheit, spielen können. Aus diesem Grund wurde die modifizierte Amyloidhypothese entwickelt, die auf diesen Sachverhalt eingeht.

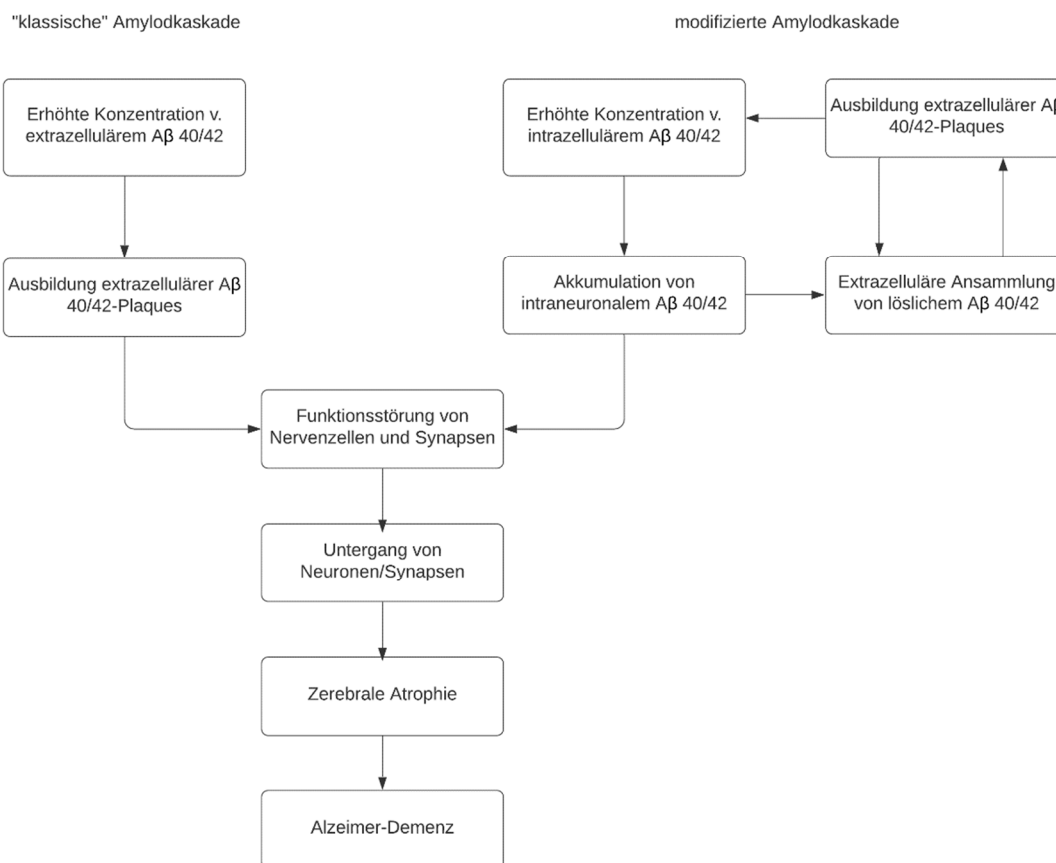


Abbildung 2: Amyloidhypothesen. Darstellung der Kaskaden von erhöhter Amyloidkonzentration zur Demenz nach der ursprünglichen Amyloidhypothese (links) und der modifizierten Amyloidhypothese (rechts). (verändert nach Wirths et al., 2004).

1.8 Amyloid- β -Aggregation

Die durch Proteolyse entstandenen A β -Monomere können sich zu Dimeren, Trimeren und höhermolekularen Oligomeren zusammenlagern, die zunächst in einer nicht-fibrillären löslichen Struktur vorliegen (Benilova et al. 2012; Walsh und Selkoe 2007). Sobald eine gewisse Konzentrationsschwelle überschritten ist, kommt es zur Polymerisation dieser Oligomere. Es bilden sich zunächst Protofibrillen und in der Folge Fibrillen aus, die ein Hauptbestandteil von Amyloidplaques sind (Walsh und Selkoe 2007). Die verschiedenen A β -Spezies neigen aufgrund ihrer voneinander abweichenden biochemischen Eigenschaften unterschiedlich stark zur Ausbildung von Fibrillen. A β_{1-42} beispielsweise bildet sowohl *in vivo* als auch *in vitro* äußerst häufig Fibrillenaggregate aus (Jarrett et al. 1993). Die Ausbildung und Ablagerung von neurotoxischen A β -Oligomeren stellt einen entscheidenden Faktor in der Entstehung und dem Fortschreiten des M. Alzheimer dar (Kayed et al. 2003; Haass und Selkoe 2007). Die ursprüngliche Annahme lautete, dass die unlöslichen A β -Ablagerungen

hauptverantwortlich für die Neurotoxizität sind (Walsh und Selkoe 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass lösliches, in Oligomeren vorliegendes $A\beta_{42}$ am besten mit Synapsenverlust und dem Abbau kognitiver Fähigkeiten bei Patienten mit M- Alzheimer korreliert (Bayer und Wirths 2010; Viola und Klein 2015). Ebenso korreliert die Konzentration von löslichen $A\beta$ -Oligomeren mit synaptischer Dysfunktion (Lue et al. 1999). Aus Gehirnen von Alzheimer-Patienten und transgenen Mausmodellen konnten die Oligomere ebenfalls isoliert werden (Shankar et al. 2008; Lesné et al. 2008).

1.9 Amyloid-Varianten

$A\beta$ kommt regelhaft im Plasma und im *Liquor cerebrospinalis* gesunder Menschen vor und wird ebenso *in vitro* von Zellen im Rahmen des normalen Metabolismus produziert (Seubert et al. 1992; Haass et al. 1992). Die so entstandenen $A\beta$ -Peptide sind von einer großen Heterogenität geprägt. Hierbei machen $A\beta_{40}$ bzw. $A\beta_{42}$ den Großteil dieser Peptide aus, wobei unter basalen Bedingungen der Anteil von $A\beta_{40}$ am gesamten produzierten $A\beta$ ca. 90% beträgt (Nhan et al. 2015). Im Vergleich zu $A\beta_{40}$ findet sich $A\beta_{42}$ in deutlich größeren Mengen und zu einem früheren Zeitpunkt in neuritischen Plaques und stellt so deren Hauptbestandteil dar (Iwatsubo et al. 1994; Lemere et al. 1996). $A\beta_{42}$ zeigt eine hohe Neigung zur Bildung von Fibrillen und Plaquebildung (Jarrett et al. 1993; Walsh und Selkoe 2007). Aber auch löslichen $A\beta_{42}$ -Formen konnten neurotoxische Eigenschaften nachgewiesen werden (Mucke et al. 2000; Lacor et al. 2007; Shankar et al. 2007). $A\beta_{40}$ gilt im Allgemeinen als weniger toxisch als $A\beta_{42}$ und kann sogar deren Oligomerisation verhindern (Murray et al. 2009). Des Weiteren scheint $A\beta_{40}$ *in vitro* sogar protektive Einflüsse auf Neuronen und deren Vorläuferzellen zu haben (Whitson et al. 1989; Chen und Dong 2009).

Neben $A\beta_{1-42}$ und $A\beta_{1-42}$ gibt es unter den verschiedenen $A\beta$ -Isoformen eine hohe Heterogenität sowohl am C- als auch am N-Terminus des Peptids. Im menschlichen *Liquor cerebrospinalis* von Alzheimer-Patienten konnten z. B. unter anderem $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$, $A\beta_{1-33}$, $A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-38}$ und $A\beta_{1-39}$ nachgewiesen werden (Wiltfang et al. 2002; Portelius et al. 2006; Portelius et al. 2012).

Ebenso wie am Carboxy-Terminus trunkierte $A\beta$ -Isoformen existieren bei der Alzheimererkrankung auch zahlreiche $A\beta$ -Varianten, die im Gegensatz zum Aspartat an erster Position unterschiedliche N-Termini aufweisen. Diese liegen z. B. an Position 4, 5, 8 und 9 (Masters et al. 1985; Sergeant et al. 2003; Takeda et al. 2004; Wirths und Zampar 2019). Ebenso wie bei den C-terminal veränderten $A\beta$ -Spezies hat eine Änderung am Aminoterminus Einfluss auf die Eigenschaften des Peptids. Nach Pike et al. (1995b) z. B.

fördert eine Verkürzung am N-Terminus die Aggregationsfähigkeit. Die Heterogenität am N-Terminus entsteht durch Trunkierung durch verschiedene Proteasen wie z. B. BACE1, Aminopeptidase A, *angiotensin converting enzyme* (ACE) und Neprilysin zwischen unterschiedlichen Aminosäuren des Peptids (Bayer und Wirths 2014; Wirths und Zampar 2019). Im Anschluss kann es noch zu weiteren posttranslationalen Modifikationen kommen. Diese beinhalten u. a. Oxidation, Phosphorylierung, Racemisierung, Nitrierung, Isomerisierung, Glycosylierung und Pyroglutamylierung (Kummer und Heneka 2014). Im Gehirn von Alzheimerpatienten liegt der Großteil der A β -Isoformen als N-trunkierte Varianten vor (Sergeant et al. 2003). Neben A β_{1-40} und A β_{1-42} wurden die Isoformen A β_{pE3-42} und A β_{4-42} als dominante Spezies im Gehirn von an M. Alzheimer erkrankten Menschen beschrieben (Portelius et al. 2010). Auf letztere Variante wird im Folgenden gesondert eingegangen.

1.9.1 A β_{4-42}

A β_{4-42} wurde bereits vor Jahrzehnten als häufige A β -Isoform beschrieben. Im Rahmen seiner Forschung an Gehirnen von Patienten mit M. Alzheimer wies Masters et al. (1985) eine N-trunkierte A β -Variante nach, deren Peptid an Position 4 mit einem Phenylalaninrest begann. Diese Variante machte mit einem Anteil von 64% den Großteil der A β -Isoformen in den Untersuchten Plaques aus (Masters et al. 1985). A β_{4-42} liegt nicht nur beim M. Alzheimer, sondern auch in den Gehirnen von Patienten mit vaskulärer Demenz und gesunden Kontrollen vor (Lewis et al. 2006). Diese Befunde konnten durch Arbeiten von Portelius et al. (2010), in denen sich A β_{4-42} neben A β_{1-42} als die häufigste Isoform im Hippocampus und Kortex von Patienten mit familiärer bzw. sporadischer Alzheimerdemenz herausstellte, untermauert werden. Im Vergleich zu längeren am N-Terminus trunkierten A β -Varianten bildet A β_{4-42} schneller lösliche Oligomere und neigt eher zu Aggregation (Pike et al. 1995b; Bouter et al. 2013). Bouter et al. (2013) konnten eine hohe neuronale Toxizität von A β_{4-42} sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach intraventrikulärer Injektion bei Wildtypmäusen nachweisen. Die Expression von A β_{4-42} im transgenen Mausmodell Tg4-42 führt bei homozygoten und im späteren Verlauf auch heterozygoten Tieren zu einem massiven Untergang von hippocampalen Neuronen und ausgeprägten kognitiven Defiziten (Bouter et al. 2013). Kürzlich wurde die Metalloprotease ADAMTS4 (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4*) als ein mögliches Kandidatenenzym zur Generierung von A β_{4-42} Peptiden beschrieben (Walter et al. 2019).

1.10 Mausmodelle des Morbus Alzheimer

Mausmodelle spielen in der Erforschung der Mechanismen der AD eine entscheidende Rolle und erlauben auch das Untersuchen therapeutischer Ansätze, wie sie in dieser Form am Menschen nicht möglich wären (Esquerda-Canals et al. 2017). Aktuell existiert eine Vielzahl verschiedener Alzheimer-Mausmodelle. Alle Mausmodelle bilden typische Charakteristika des M. Alzheimer (siehe Absatz 1.6) ab, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Ebenso existiert zur Zeit auch kein Modell, das zuverlässig alle neuropathologischen Alzheimer-Charakteristika ausbilden kann (Hall und Roberson 2012).

Die meisten transgenen Mausmodelle beruhen auf Mutationen, wie sie auch bei der autosomal-dominanten familiären Alzheimer-Demenz (FAD) vorkommen. So exprimieren zum Beispiel viele Modelle mutiertes humanes *APP*. Als Beispiele seien hier das erste auf einer *APP*-Mutation beruhende Mausmodell PDAPP (Games et al. 1995) und das Tg2576-Modell genannt (Hsiao et al. 1996), das eines der am genauesten untersuchten AD-Modelle ist. Es existieren auch noch weitere Mausmodelle, die auf einer *APP*-Mutation beruhen. Im Allgemeinen zeigen diese Tiere erhöhte Konzentrationen von β -Amyloiden sowie extrazelluläres A β und entwickeln Verhaltensdefizite und kognitive Einschränkungen (Sturchler-Pierrat et al. 1997; Chishti et al. 2001).

Neben den auf *APP*-Mutationen basierenden transgenen Mausmodellen existieren ebenso zahlreiche Präsenilin-Modelle (Duff et al. 1996; Guo et al. 1999). Besonders bei diesen Tieren ist, dass sie trotz erhöhter A β -Konzentrationen keine Plaques entwickeln (Cavanaugh et al. 2014). Vertreter dieser Mauslinien entwickeln u. a. einen veränderten axonalen Transport und milder ausgeprägte kognitive Defizite (Duyckaerts et al. 2008).

Um mehr, deutlicher ausgeprägte und schneller auftretende Alzheimerpathologien zu erreichen, wurden Modelle entwickelt, bei denen eine Kombination verschiedener *APP*- und/oder *PSEN*-Mutationen gleichzeitig vorliegen (Sturchler-Pierrat et al. 1997; Chishti et al. 2001; Blanchard et al. 2003). Die Anzahl dieser Kombinationen kann unterschiedlich sein. Das 3xTg-Mausmodell ist ein Beispiel für eine Dreifachkombination (Oddo et al. 2003), bei der *APP/PS1KI*-Modell liegen hingegen vier Mutationen vor (Casas et al. 2004). Das 5xFAD-Modell z. B. weist sogar fünf verschiedene Mutationen auf (Oakley et al. 2006).

Ein Problem ist jedoch, dass nur wenige transgene Mausmodelle einen deutlichen Neuronenverlust abbilden (Wirhth und Bayer 2010; Wirhth und Zampar 2020). Des Weiteren exprimieren diese Modelle, wenn überhaupt, N-terminal trunkierte A β -Peptide nur in geringem Maße, was jedoch nicht die realen Verhältnisse dieser A β -Varianten im Gehirn von Alzheimer-Patienten widerspiegelt (Bayer und Wirhth 2014). Ein weiterer Punkt ist, dass

die o.g. transgenen Modelle auf einer oder mehreren Mutationen der familiären Alzheimer-Demenz (FAD) beruhen. Der Anteil von FAD an den gesamten Fällen von Morbus Alzheimer ist jedoch nur gering (Harvey et al. 2003).

Das transgene Mausmodell Tg4-42, das in dieser wissenschaftlichen Arbeit verwendet wurde, wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt. Sie sind auf dem genetischen Hintergrund der C57BL/6J-Linie aufgebaut. Die Mäuse dieses Typs tragen ein unter der Kontrolle des neuronalen Thy-1-Promotor exprimiertes Transgen, das an murines prä-pro-TRH (Thyreotropin-Releasing-Hormon) fusioniertes A β ₄₋₄₂ exprimiert (Wittnam et al. 2012; Bouter et al. 2013). Das TRH fungiert hierbei als Signalpeptid für die Lokalisation im sekretorischen Weg und wird während der Prozessierung abgespalten. Tg4-42 eignet sich als Modell für den sporadischen Morbus Alzheimer, da es ohne die typischen FAD-Mutationen auskommt. Die genauen Eigenschaften dieses transgenen Mausmodells werden unter Absatz 2.2.1 gesondert dargestellt.

1.11 Therapie

Bis heute sind die Möglichkeiten einer Therapie des Morbus Alzheimer stark begrenzt. Diese stützt sich vornehmlich auf die Behandlung der Symptome, die mit der Erkrankung assoziiert sind. Im klinischen Alltag haben vor allem verschiedene Wirkstoffe aus der Klasse der Cholinesterasehemmer sowie der NMDA-Rezeptorblocker Memantin einen Stellenwert in der Alzheimer-Therapie.

Im Bereich der Cholinesterasehemmer existieren momentan die drei Wirkstoffe Galantamin (Janssen), Donepezil (Pfizer) und Rivastigmin (Novartis), die zur Behandlung im Rahmen einer milden bis moderaten Alzheimer-Krankheit zum Einsatz kommen (Lahiri et al. 2002). Die Wirkweise der Cholinesteraseinhibitoren stützt sich auf die cholinerge Hypothese bei M. Alzheimer. Diese Hypothese besagt, dass die für diese Krankheit typischen Störungen des Gedächtnisses und andere kognitive Defizite der Patienten zumindest zu einem Teil auf einen frühen Untergang von cholinergen Neuronen im Gehirn zurückzuführen sind (Schliebs und Arendt 2006; Bartus et al. 1982; Cummings und Back 1998; Schliebs und Arendt 2006). Dadurch kommt es in der Folge zu einem Mangel des Botenstoffes Acetylcholin. Wie der Name schon vermuten lässt, hemmen Cholinesterasehemmer den Abbau des Botenstoffes Acetylcholin im synaptischen Spalt durch die Cholinesterase. Dadurch kann das Acetylcholin länger an den postsynaptischen Rezeptoren wirken. Im Krankheitsverlauf kann die Entwicklung der kognitiven Einschränkungen verzögert werden (Cummings 2003).

Memantin ist der zweite wichtige Wirkstoff für die Behandlung von Alzheimersymptomen. Dieses Derivat des Amantadins stellt einen nichtkompetitiven Antagonisten des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors dar und greift somit hemmend in das glutamaterge System ein. Die Neuronen werden so vor der Exozytotoxizität des Glutamats geschützt (Chen et al. 1992; Danysz und Parsons 2003). Randomisiert-kontrollierte Studien zeigten nach einer Einnahmedauer von sechs Monaten einen deutlich positiven Effekt auf kognitive Funktionen und Alltagskompetenzen bei Patienten mit moderatem bis schwerem M. Alzheimer (Areosa und Sherriff 1996; McShane et al. 2006). Beide oben genannten Wirkstoffgruppen können sowohl in Mono- als auch als Kombinationstherapie verschrieben werden. Bei einer kombinierten Gabe von Cholinesteraseinhibitoren und Memantin konnte bei Patienten mit moderat bis schwerem M. Alzheimer ein signifikant positiver Effekt auf die kognitiven Fähigkeiten im Vergleich zu alleiniger Gabe von Memantin festgestellt werden (Tariot et al. 2004). Bei Patienten, die an mild ausgeprägten Symptomen litten, ließen sich hingegen keine deutlichen Effekte feststellen (Areosa und Sherriff 1996).

Im klinischen Alltag treten häufig Begleitsymptome der Alzheimer-Erkrankung auf, die ebenfalls behandlungsbedürftig sind. Schlafstörungen können mit Neuroleptika behandelt werden. Hier bietet sich beispielweise der Wirkstoff Melperon an, da er als atypisches Neuroleptikum keine anticholinergen Wirkungen zeigt, die wie oben beschrieben, unerwünscht sind. Psychotischen Zuständen, und aggressivem Verhalten können ebenfalls Neuroleptika entgegengestellt werden. Aufgrund ihrer geringen Neigung parkinsonähnliche Symptome hervorzurufen, werden atypische Neuroleptika bevorzugt (Ballard et al. 2011). Schwere Depressionen, an denen Alzheimer-Patienten im Laufe der Krankheit häufig leiden, können mit selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRIs) oder Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (*selective serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors*, SSNRIs) behandelt werden (Zec et al. 2008; Ballard et al. 2011). Allerdings ist die Wirkung i.R. einer Alzheimer-Erkrankung nicht eindeutig belegt. Eine Studie mit Sertralin ergab beispielsweise keine positiven Effekte auf mit M. Alzheimer assoziierte Depressionen (Weintraub et al. 2010). Regelmäßige körperliche Betätigung kann sich ebenfalls positiv auf die begleitenden Depressionen auswirken (Teri et al. 2003).

Weitere neuere therapeutische Behandlungsmethoden befinden sich aktuell noch in der Entwicklung. Ein Großteil dieser Therapieansätze hat hier das A β -Peptid im Fokus. Hierzu gehören zum Beispiel unter anderem passive und aktive Immunisierungen sowie modulierende bzw. inhibierende Substanzen (Müller et al. 2019). Modulatoren und Inhibitoren haben vor allem die an der Spaltung von APP beteiligten α -, β - und γ -Sekretasen als Angriffspunkt. Das Ziel hierbei ist, eine Verminderung der A β -Produktion zu erreichen.

Die Herausforderung bei der Entwicklung entsprechender Wirkstoffe ist, dass nicht nur APP ein Substrat dieser Enzyme darstellt und somit Einfluss auf zahlreiche andere wichtige Prozesse im Körper genommen wird (Mangialasche et al. 2010). Aktive und passive Immunisierungen zielen im Gegensatz dazu auf den Abbau bereits bestehender Ablagerungen von A β ab. Die aktive Immunisierung hat eine langanhaltende körpereigene Bildung von Antikörpern gegen ein zuvor verabreichtes Antigen (hier A β) als Ziel. Als Beispiel sei hier eine Studie genannt, bei der humanes A β_{1-42} verwendet wurde. Nach vielversprechenden Ergebnissen in Tierversuchen musste die entsprechende Phase II-Studie jedoch abgebrochen werden, nachdem es zu mehreren Fällen von am ehesten T-Zell-vermittelten aseptischen Meningoenzephalitiden kam. Zudem zeigten nur eine geringe Anzahl der behandelten Patienten eine Antikörperantwort (Gilman et al. 2005). Aktive Immunisierungen der zweiten Generation versuchen eine T-Zell-Antwort zu vermeiden. Von diesen hat aktuell nur ein Wirkstoffkandidat die Phase 3 erreicht (van Dyck 2018). Aufgrund der o.g. Nebenwirkungen und der Tatsache, dass aktive Immunisierungen bei älteren Menschen häufig eine sehr variable Antikörperantwort zur Folge haben, hat das Konzept der passiven Immunisierung in der Alzheimer-Forschung an Attraktivität gewonnen (van Marum 2008). Die passive Immunisierung basiert auf gegen A β gerichteten monoklonalen Antikörpern (oder selten auch polyklonalen Immunglobulinen), die dadurch den Abbau von A β -Ablagerungen fördern (Mangialasche et al. 2010). Studien an Tiermodellen konnten zeigen, dass entsprechende Antikörper die Bildung von Oligomeren verhindern und Amyloidablagerungen im Gehirn reduzieren können. Damit einhergehend ließen sich Verbesserungen in kognitiven Funktionen feststellen (Wilcock und Colton 2008). Ein Nachteil im Vergleich zur aktiven Immunisierung ist, dass bei der passiven Immunisierung die Immunglobuline wiederholt verabreicht werden müssen, was diese Therapieform weniger kosteneffektiv macht (Lemere 2013). Über das letzte Jahrzehnt wurden viele verschiedene monoklonale Antikörper, die A β binden können, entwickelt und einige wurden zu Studien an Menschen zugelassen (van Dyck 2018). Beispielhaft wird im Folgenden kurz auf die Wirkstoffe Aducanumab, Bapineuzumab, Crenezumab sowie Solanezumab eingegangen, da diese alle die Phase 3 entsprechender klinischer Studien erreicht hatten.

Bapineuzumab (Pfizer und Janssen) ist ein humanisierter monoklonaler IgG1-Antikörper und bindet an den N-Terminus von A β und ist sowohl bei löslichem als auch fibrillärem A β wirksam. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass der Antikörper in das zentrale Nervensystem eindringt und die Phagozytose von A β -Ablagerungen induziert (Bard et al. 2000). Als erster monoklonaler Antikörper wurde Bapineuzumab zu Phase-I-Studien am

Menschen zugelassen. Hierbei zeigte sich zunächst eine gute Verträglichkeit, bei einigen Patienten, die die höchste Dosis erhalten hatten, konnten in MRT-Untersuchungen jedoch vasogene Ödeme gesehen werden (Black et al. 2010). In einer darauffolgenden Phase-II-Studie konnte in Aufnahmen mittels PiB-PET ein gewisser Abbau von A β festgestellt werden (Rinne et al. 2010). Eine weitere Phase II- und zwei Phase III-Studien ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede in den verwendeten kognitiven Tests (ADAS-Cog11 bzw. *Disability Assessment for Dementia*) und somit wurden die primären Endpunkte verfehlt (Salloway et al. 2009; Salloway et al. 2014). Letztendlich wurden 2012 alle Studien mit Bapineuzumab eingestellt.

Solanezumab (Lilly) ist ein humanisierter monoklonaler IgG1-Antikörper, der an die mittlere Domäne von A β bindet und vor allem zum Abbau von löslichem A β beiträgt (DeMattos et al. 2001). In den klinischen Studien der Phase III zeigte Solanezumab eine gute Verträglichkeit, scheiterte jedoch ebenfalls an den primären Endpunkten, sodass die Entwicklung eingestellt wurde (Doody et al. 2014).

Der humanisierte monoklonale IgG4-Antikörper Crenezumab (Genetech) ist ebenfalls gegen die mittlere A β -Domäne gerichtet, wobei es sowohl Fibrillen als auch Mono- und Oligomere bindet (Ultsch et al. 2016; Cummings et al. 2018). In einer Phase-II-Studie ließen sich im Allgemeinen keine signifikanten Ergebnisse bei behandelten Patienten mit milder bis moderater Alzheimer-Demenz feststellen. Eine post-hoc-Subgruppenanalyse der Patientenkohorte, die die höchste Dosis erhalten hatten, zeigte eine leichte Verbesserung in den kognitiven Tests der Patienten mit den mildesten Symptomen (Cummings et al. 2018). Aktuell wird Crenezumab in hoher Dosierung im Rahmen einer Phase-III-Studie an Patienten in sehr frühen Alzheimerstadien untersucht.

Im Gegensatz zu den o.g. Antikörpern ist Aducanumab (Biogen) ein vollständig humaner monoklonaler IgG1-Antikörper. Er bindet an den N-Terminus des A β -Peptids, reagiert auch mit Oligomeren und Fibrillen und zeigte im Mausmodell eine Reduktion von löslichem und unlöslichen A β (Sevigny et al. 2016). Am Menschen zeigten sich im Rahmen einer Phase-Ib-Studie Hinweise auf eine Reduktion von fibrillärem A β im Gehirn von Patienten mit Alzheimer-Demenz in frühen Stadien. Zudem konnte eine Verlangsamung in der Verschlechterung bei den verwendeten kognitiven Test gezeigt werden (Sevigny et al. 2016). Vor kurzem wurden zwei Phase-III-Studien durchgeführt, die nach anfänglichen Aussagen des Herstellers ihre primären Endpunkte nicht erreichen würden und somit vorzeitig abgebrochen wurden. Kurz darauf erfolgte jedoch eine Neubewertung der zwischenzeitlich zusätzlich verfügbaren Daten, die zeigte, dass in einer der beiden Studien (EMERGE,

NCT02484547) der primäre Endpunkt, eine signifikante Verzögerung des Abbaus im kognitiven Test CDR-SB, doch erreicht werden konnte (Biogen 2020). Im November 2020 reichte Biogen bei der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) einen Antrag auf Zulassung von Aducanumab vor, dem diese im Sommer 2021 trotz eines negativen Expertenvotums stattgab (Cavazzoni 2021).

Die oben beschriebenen Umstände machen deutlich, dass die Entwicklung von Therapeutika gegen M. Alzheimer äußerst langsam vorstättengeht und eine sehr lange Zeit verstreicht, bis diese im klinischen Alltag Anwendung finden. Die aktuellen Therapiekonzepte sind seit Jahrzehnten nicht wesentlich verändert worden und lediglich auf Symptomlinderung ausgelegt. Ein kausaler pharmakologischer Therapieansatz existiert zurzeit nicht außerhalb von klinischen Studien. Auch wenn das Konzept der passiven Immunisierung auch vor dem Hintergrund der Ergebnisse der EMERGE-Studie in der Zukunft an Bedeutung gewinnen könnte, so ist zu bedenken, dass zum jetzigen Zeitpunkt die (wenigen) signifikanten Effekte bei Patientenkollektiven gemessen wurden, die an M. Alzheimer in frühen Krankheitsstadien litten. Diese Tatsachen, die lange präklinische Phase des M. Alzheimer, sowie der in Metaanalysen beschriebene Umstand, dass ca. ein Drittel der Alzheimererkrankungen weltweit auf modifizierbare Risikofaktoren zurückzuführen ist, verdeutlicht den Stellenwert präventiver Interventionsstrategien (Norton et al. 2014). Hierbei hat unter anderem ein aktiver, sportlicher Lebensstil große Bedeutung (Müllers et al. 2019).

1.12 Kognitive Reserve

Die Alzheimer-Krankheit ist u. a. charakterisiert durch eine sehr große klinische Heterogenität, d.h. dass es bei vielen Alzheimer-Patienten eine starke Diskrepanz zwischen dem Ausmaß an neuropathologischen Veränderungen und der Schwere der Krankheitssymptome gibt. So konnten Katzman et al. (1988) in einer Arbeit in den späten Achtzigerjahren, bei der *post mortem* die Gehirne von Bewohnern eines Altersheimes untersucht worden waren, zeigen, dass einige Bewohner mit ausgeprägten pathologischen Veränderungen zu Lebzeiten nur milde Alzheimersymptome aufwiesen. Dies führte zu der Überlegung, dass im Gehirn also eine Art „Reserve“ vorliegen muss, auf die einige Patienten zurückgreifen können und so trotz umfassender pathologischer Veränderungen die Funktionalität weiter erhalten bleibt. Als diese Reserve wurde zunächst die Größe des Gehirns, und daraus folgernd die Menge an Neuronen und Synapsen, deren Verlust im Verlauf der Krankheit toleriert werden können, vermutet (Katzman et al. 1988; Schofield et al. 1997). Später wurde dieses rein quantitative Konzept der sog. *brain reserve* durch das

Konzept der Kognitiven Reserve erweitert, bei der im Gegensatz zur Hirngröße die Funktion des Gehirns den zwischen Pathologie und klinischen Symptomen vermittelnden Faktor darstellt. Beim Konzept der Kognitiven Reserve hat das selbe Ausmaß an krankhaften Veränderungen im Gehirn unterschiedliche Auswirkungen auf die Krankheitsausprägung, selbst wenn die Gehirngröße konstant gehalten wird (Stern 2012). Relativ früh wurde u. a. Bildung als wichtige Einflussgröße auf die Wahrscheinlichkeit, eine Demenz zu entwickeln, vermutet (Zhang et al. 1990). Stern et al. (1992) konnten in einer Arbeit zeigen, dass es bei nach ähnlichen klinischen Symptomen geordneten Alzheimer-Patienten im PET-CT ein inverses Verhältnis zwischen dem regionalen cerebralen Blutfluss (rCBF), der als Maß für die Hirnfunktion gesehen wird, und den Jahren an genossener Bildung gab. Später konnte gezeigt werden, dass Menschen, die während Ihres Lebens weniger als 8 Jahre auf ihre Bildung verwendet hatten, einem mehr als doppelt so großen Risiko, an einer Demenz zu erkranken, ausgesetzt waren (Stern et al. 1994). Dieser Sachverhalt konnte auch durch post-mortem-Studien untermauert werden (Bennett et al. 2003). Neben Bildung spielt ebenfalls das Ausmaß der während der mittleren und späteren Lebenszeit nachgegangenen Freizeitaktivitäten eine wichtige Rolle für die kognitive Reserve. Hier zeigt sich ein ähnlicher Zusammenhang: Ein ausgiebig und mit vielen Freizeitaktivitäten verbrachtes Leben reduziert das Risiko für eine Alzheimer-Erkrankung (Scarmeas et al. 2001). Paillard-Borg et al. (2012) konnten zeigen, dass geistige, soziale und körperliche Aktivität den Beginn von kognitivem Abbau verzögern kann und dass dieser Zeitpunkt weiter nach hinten geschoben werden kann, je breiter die Kombination dieser Aktivitätentypen war. Weitere auf dem bildgebenden Verfahren der PET-CT beruhende Arbeiten konnten bei Patienten mit M. Alzheimer ebenfalls eine umgekehrte Beziehung zwischen dem Ausmaß an Bildung und Freizeitaktivitäten und den neuropathologischen Veränderungen im Gehirn aufzeigen (Alexander et al. 1997; Landau et al. 2012; Perneczky et al. 2006). Diese Sachverhalte legen nahe, dass die kognitive Entwicklung im fortschreitenden Lebensalter aktiv durch Entscheidungen im Bereich der Lebensumstände beeinflusst werden kann. Genetische Begebenheiten in Bezug auf die Hirnstruktur und deren neuronale Verschaltungen können jedoch ebenfalls einen Einfluss auf die Kompensationsfähigkeit des Gehirns haben, sodass sich die Kognitive Reserve aus genetischen und Umwelteinflüssen zusammensetzt (Stern 2009; Swan und Carmelli 2002).

1.13 *Enriched Environment*

Um die oben beschriebenen Effekte eines aktiven und kognitiv simulierenden Lebenswandels tiefergehend untersuchen zu können, wurde dieses Konzept auf tierexperimentelle Modelle übertragen. Hierzu kommt das Paradigma des *Enriched Environment* (EE) zur Anwendung. In der Standardhaltung steht den Tieren, wenn überhaupt, nur eine kleine Menge an Objekten, mit denen interagiert werden kann, zur Verfügung. Das EE zielt darauf ab, die Lebensräume der Versuchstiere abwechslungsreicher und komplexer zu gestalten und somit die sensorische Stimulation und kognitive und körperliche Aktivität zu steigern (Nithianantharajah und Hannan 2006). Dies wird meist durch das Einbringen von Objekten unterschiedlicher Formen und Farben in die Tierkäfige erreicht. Des Weiteren kommen auch Objekte, die zum Ziel haben, die körperliche Aktivität der Versuchstiere zu steigern, zum Einsatz. Beispielsweise seien hier Häuser, Tunnel, Laufräder und -teller genannt. Die Position und Anzahl dieser Gegenstände wird während des Versuchszeitraums regelmäßig verändert. Zusätzlich steht den Tieren häufig ein größerer Käfig und zusätzliches Nistmaterial zur Verfügung. Außerdem leben die Tiere im EE im Vergleich zur Standardhaltung häufig in größeren Gruppen zusammen, was die soziale Interaktion der Tiere untereinander fördert. EE beruht also sowohl auf der körperlichen und geistigen Stimulation durch Objekte als auch durch soziale Wechselwirkungen (Rosenzweig et al. 1978b). Man geht davon aus, dass durch die „angereicherte Umgebung“ die Nervenaktivität durch verschiedene Systeme gesteigert wird und es zudem zu Veränderungen auf einer zellulären und molekularen Ebene kommt (Hannan 2014). Es muss jedoch beachtet werden, dass der Begriff des EE nicht einheitlich festgelegt ist, sondern nur einen Unterschied zu den Bedingungen der Standardtierhaltung beschreibt, die von Einrichtung zu Einrichtung verschieden sein können. Die EE-Protokolle können sich beispielsweise im Hinblick auf die Gruppengröße, Anzahl und Abwechslungsreichtum der stimulierenden Objekte und der Versuchsdauer stark voneinander unterscheiden (Nithianantharajah und Hannan 2006). Die erste Form von EE wurde bereits in den Vierzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts durch den Neurowissenschaftler Donald Hebb beschrieben. Er beobachtete bei Ratten, die sich bei ihm zu Hause frei bewegen konnten, positive Auswirkungen auf Problemlösung im Vergleich zu einer unter Standardbedingungen gehaltenen Kontrollgruppe (Hebb 1947). Seitdem wurden zahlreiche Arbeiten zum Thema EE durchgeführt und dessen Auswirkungen auf sowohl Wildtypen als auch genetisch veränderte Tiermodelle untersucht. Es konnte u. a. gezeigt werden, dass EE einen positiven Einfluss auf die Neurogenese und Zellproliferation im Gyrus dentatus gesunder Mäusehirne hat (van Praag et al. 1999; Kempermann et al. 1997). Außerdem konnte in mehreren Studien eine Verbesserung des

räumlichen Lernens nachgewiesen werden (Pacteau et al. 1989; Fordyce und Farrar 1991; Wainwright et al. 1993). Auf genetischer Ebene führt EE zu einer geänderten Expression von Genen, die in Verbindung mit neuronaler Plastizität, Signalübertragung, Erinnerung und Lernen stehen (Rampon et al. 2000).

1.14 Hypothese und Zielsetzung dieser Arbeit

Innerhalb der letzten Jahre ist es zu einer wachsenden Evidenz protektiver Eigenschaften von körperlicher und geistiger Aktivität auf die Entwicklung und das Fortschreiten von M. Alzheimer gekommen (Heyn et al. 2004; Rovio et al. 2005; Scarmeas et al. 2011). $A\beta_{4-42}$ liegt in Gehirnen an AD erkrankten Patienten in hoher Konzentration vor und hat seine Bedeutung als möglicher wichtiger Faktor zur Entstehung von M. Alzheimer gezeigt (Masters et al. 1985; Bouter et al. 2013). Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte transgene Mausmodell Tg4-42 exprimiert menschliches $A\beta_{4-42}$ und zeigt entsprechende intraneuronale Ablagerungen in Abwesenheit von Amyloidplaques. Im Altersverlauf präsentiert es zuverlässig Defizite in Motorik- und Verhaltenstest und zeigt einen deutlichen Untergang von hippocampalen Neuronen, vor allem in der Pyramidenzellregion CA1 (Bouter et al. 2013). Aufgrund der Tatsache, dass bei diesem Mausmodell keine Mutationen des familiären M. Alzheimer vorliegen, liegt nahe, dass sich Tg4-42-Tiere als Modellsystem zur Untersuchung der sporadischen AD eignen könnten.

Aufgrund der oben beschriebenen Begebenheiten sollte die Hypothese geprüft werden, dass gesteigerte körperliche und kognitive Aktivität im Sinne einer präventiven Maßnahme positive Auswirkungen auf das transgene AD-Modell Tg4-42_{hom}, vor allem in Hinblick auf Gedächtnisfunktionen und vermindertem Untergang hippocampaler Neuronen, haben könnte. Aufgrund von Vorarbeiten war bereits bekannt, dass Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von acht Monaten bereits erhebliche Einschränkungen des räumlichen Gedächtnisses im *Morris Water Maze Test* (MWM), verbunden mit einer im Vergleich zu Wildtyptieren (WT) deutlich verminderten Neuronenzahl im Abschnitt CA1 des Hippocampus aufweisen. Im Alter von zwei Monaten war dies noch nicht zu beobachten (Bouter et al. 2013). Es war weiterhin nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt sich die oben beschriebenen Defizite messbar manifestieren.

Diese Arbeit ist deshalb in zwei Abschnitte aufgeteilt: Im ersten Abschnitt wurde das Mausmodell Tg4-42_{hom} weiter im Altersverlauf untersucht, wobei hier unter Standardbedingungen gehaltene Tiere (siehe 2.3.1) im Alter von fünf, sechs und sieben Monaten verschiedenen Motorik- und Verhaltenstests unterzogen (Abschnitt 2.1) wurden und im Anschluss mittels design-basierter Stereologie die Neuronenzahl im Abschnitt CA1

des Hippocampus bestimmt wurde. In den jeweiligen Altersgruppen befanden sich sowohl männliche als auch weibliche Tiere. Die Experimente dieses Abschnitts wurden zusammen mit Henning Borgers durchgeführt. Die dort erhobenen Daten finden sich dementsprechend auch in der entsprechenden Dissertationsschrift wieder (Borgers 2017).

Der zweite Teil der Arbeit zielte auf die Klärung der o.g. Hypothese ab. Für die körperliche und geistige Stimulation wurde das Paradigma des EE (siehe 1.13) herangezogen. Hierzu wurden transgene Tg4-42_{hom} Tiere nach zwei Monaten aus der Standardhaltung (SH) in EE-Haltungsbedingungen überführt. Der gewählte Zeitpunkt beruht auf der Beobachtung, dass Tg4-42_{hom}-Tiere in diesem Alter noch keine messbaren Defizite bzw. Neuronenverlust zeigen (Bouter et al. 2013). Anschließend wurden die Versuchstiere bis zu dem entsprechenden Alter unter diesen Bedingungen gehalten, in dem sich bei den Vergleichstieren des ersten Arbeitsabschnitts auffällige Einschränkungen in den Verhaltenstests manifestierten. Abschließend wurden die Tiere aus dem EE den gleichen Verhaltensversuchen wie die SH-Tiere unterzogen und die Neuronenzahl in der CA1-Region mittels designbasierter Stereologie bestimmt. In der Auswertung wurden die Ergebnisse auf mögliche Verbesserungen in Gedächtnisfunktion bzw. Neuronenzahl untersucht. Da sich in der EE-Gruppe nur weibliche Tiere befanden, erfolgte der Vergleich ebenfalls mit weiblichen Tieren aus der gleichaltrigen SH-Gruppe. Der Aufbau dieser Arbeit ist in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt.

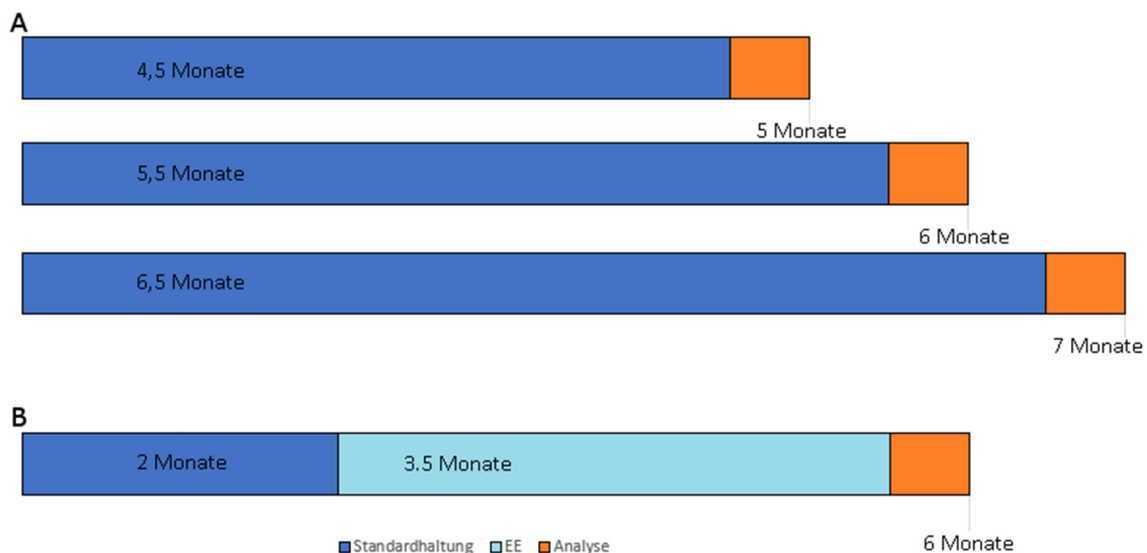


Abbildung 3: Aufbau dieser Arbeit. (A) Im ersten Abschnitt dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde das Mausmodell Tg4-42_{hom} im Altersverlauf beleuchtet. Hierzu wurden 3 verschiedene Tiergruppen unter Standardhaltungsbedingungen (SH) gehalten. Anschließend wurden sie einer ca. 15 Tage dauernden Testbatterie unterzogen und das Hirngewebe stereologisch untersucht (Analyse, siehe Kapitel 2.1). Zum Versuchsende waren die Tiere der drei Gruppen etwa fünf, sechs bzw. sieben Monate alt. **(B)** Nachdem im ersten Abschnitt der genaue Zeitpunkt, an dem sich messbare Defizite in Gedächtnisfunktionen bei Tg4-42_{hom}-Mäusen manifestieren, bestimmt wurde, wurde der Einfluss des EE untersucht. Hierzu werden einige Tiere nach zwei Monaten unter Standardhaltung in EE-Bedingungen überführt. Anschließend wurden die Tiere unter diesen Bedingungen gehalten, bis sie das im ersten Abschnitt ermittelte Alter erreichten, bei dem sich messbare Defizite zeigten. Zuletzt erfolgte die Analyse analog den anderen Altersgruppen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Der Aufbau dieser wissenschaftlichen Arbeit gliederte sich in zwei Bausteine. Zunächst wurden die Mäuse im Alter von ungefähr fünf, sechs und sieben Monaten verschiedenen Verhaltenstests zum Einschätzen von Gedächtnisfunktionen sowie motorischen Fähigkeiten ausgesetzt. Diese Testbatterie dauerte mindestens 15 Tage. Anschließend wurden die Tiere nach den unten beschriebenen Verfahren getötet, das Hirngewebe entsprechend aufbereitet und die Anzahl der Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus mittels Stereologie bestimmt. Nachdem der richtige Zeitpunkt zur Untersuchung der Effekte des EE festgestellt wurde, wurden die unter EE-Bedingungen gehaltenen Versuchstiere in dem entsprechenden Alter den gleichen Tests unterzogen und die Neuronenzahl im Abschnitt CA1 bestimmt. Zur Benennung der Altersgruppen der Tiere wurde das Alter zum Versuchsende verwendet und auf den nächsten ganzen Monat aufgerundet. So ergibt sich, dass die Tiere zum Zeitpunkt der motorischen Untersuchungen und Verhaltenstests zum Teil mehrere Tage jünger als ihre angegebene Altersgruppe sein können. Dieses Vorgehen wurde zur Vereinheitlichung und besseren Übersicht gewählt, um das Alter zum Zeitpunkt der stereologischen Analyse besser darzustellen.

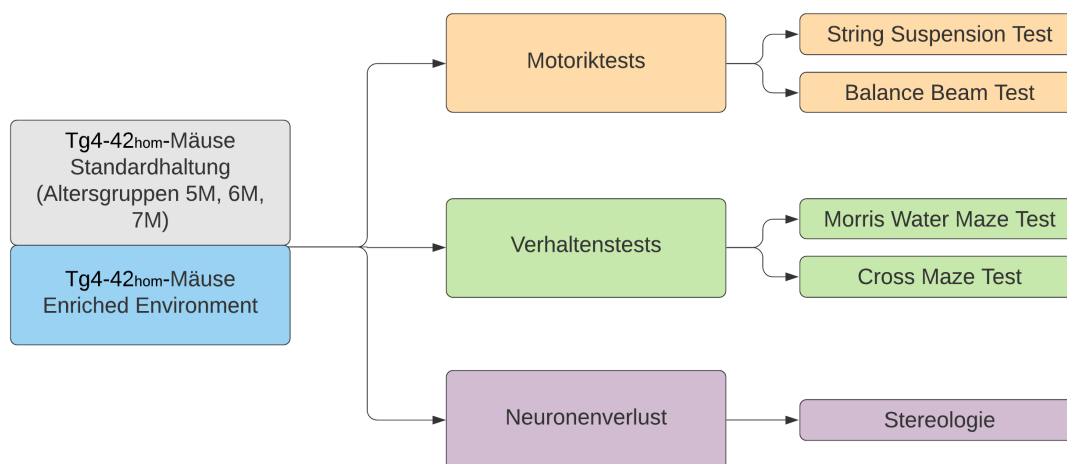


Abbildung 4: Allgemeiner Versuchsaufbau. Schematische Übersicht der Gliederung der im Folgenden beschriebenen Versuche. Die Tg4-42_{hom}-Mäuse der verschiedenen Altersklassen (fünf, sechs und sieben Monate) aus der Standardhaltung wurden ebenso wie die Tg4-42_{hom}-Tiere aus dem EE verschiedenen Versuchen zugeführt. Zur Testung der motorischen Fähigkeiten kamen der *String Suspension Test* sowie der *Balance Beam Test* zum Einsatz. Als Verhaltenstest wurden der *Morris Water Maze Test* und der *Cross Maze Test* durchgeführt. Im Anschluss an diese Testbatterie wurden die Tiere getötet und Hirnschnitte zur Stereologie präpariert. Hierdurch ließ sich der Neuronenverlust in der Pyramidenzellschicht CA1 des Hypocampus bestimmen. Die Benennung der Altersklassen erfolgte anhand des Alters zum Zeitpunkt des Todes (auf ganzen Monat aufgerundet).

2.2 Verwendete Tiere

Die Tiere, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, gehören allesamt der Spezies *Mus musculus* (Hausmaus) an. Die Haltung erfolgte analog den Richtlinien der „Gesellschaft für Versuchstierkunde/Society of Laboratory Animal Science“ (GV-SOLAS) sowie der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA). Die im Folgenden aufgeführten Versuche wurden durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt.

2.2.1 Das Mausmodell Tg4-42_{hom}

Für alle Versuche und Verhaltenstests dieser Arbeit wurden homozygote Tiere des Alzheimer-Mausmodells Tg4-42 verwendet, das in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und beschrieben wurde (Wittnam et al. 2012; Bouter et al. 2013; Bouter et al. 2014). Bei diesem Tiermodell handelt es sich um transgene Mäuse, die das humane A β ₄₋₄₂-Peptid ohne eine entsprechende FAD-Mutation exprimieren, Dieses A β ₄₋₄₂ ist an das murine prä-pro-TRH-

Peptid (Thyreotropin Releasing Hormon) gebunden, das unter der Kontrolle eines Thy1-Promotors steht. Dieser murine Thy1-Promotor stellt die neuronale Expression des prä-pro-TRH- $A\beta_{4-42}$ -Fusionspeptids sicher. Im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat des Neurons wird dieses Peptid weiter prozessiert und $A\beta_{4-42}$ durch Sekretion freigesetzt. Die für diese Arbeit verwendete homozygote Linie Tg4-42_{hom} wurde in vorhergegangenen Arbeiten durch Bouter et al. (2013) mittels Kreuzung heterozygoter Tiere und anschließender Kontrolle durch Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real Time PCR) generiert. Anschließend wurden homozygote Tiere miteinander verpaart.

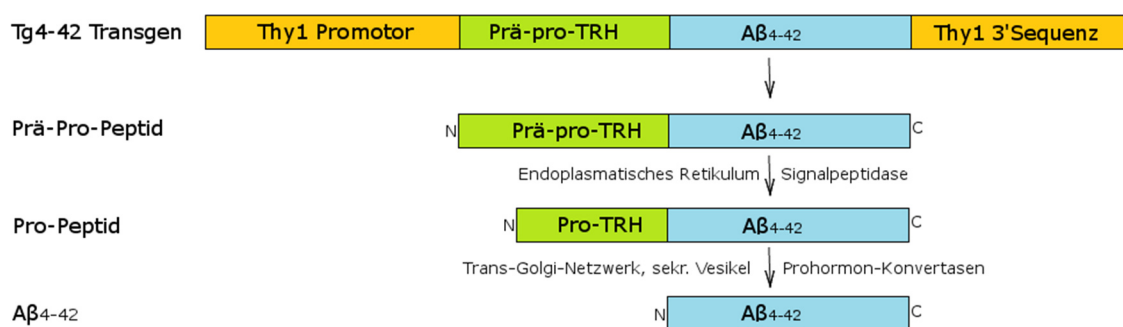


Abbildung 5: Das Tg4-42-Transgen. Schematische Darstellung der Produktion von $A\beta_{4-42}$ im Mausmodell Tg4-42. Die neuronale Expression des Prä-pro-TRH- $A\beta_{4-42}$ -Fusionspeptids wird durch den murinen Thy1-Promotor angetrieben. Durch eine N-terminale Signalsequenz gelangt das Prä-Pro-Peptid in das endoplasmatische Retikulum, wo es durch eine Signalpeptidase gespalten und das Pro-Peptid freigesetzt wird. Im Trans-Golgi-Netzwerk und sekretorischen Vesikeln wird der Rest des TRH-Signalpeptids durch Prohormon-Konvertasen geschnitten und es wird $A\beta_{4-42}$ sekretiert (Darstellung nach Wittnam (2012)).

2.3 Tierhaltung

2.3.1 Standardhaltung

Alle für die Versuche verwendeten Mäuse wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) gezüchtet. Die Tierhaltung erfolgte von Geburt der Tiere an in 33 cm x 18 cm x 14 cm großen sog. *individually ventilated cages* (IVC, individuell belüftete Käfige, Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland). Als Unterlage diente Tierstreu, ebenso wurde den Mäusen zum Nestbau grob zerrissener Zellstoff zur Verfügung gestellt. Die Wasser- und Nahrungsaufnahme wurde durch eine Wasserflasche und ausreichend bereitgestellte Nahrung *ad libitum* ermöglicht. Die Gruppengröße betrug für Weibchen vier bis fünf Individuen pro Käfig, während männliche Tiere in Einzelkäfigen gehalten wurden. Ein Tag-Nachtzyklus mit jeweils 12 Stunden dauernden Hell- bzw. Dunkelphasen wurde durchgehend aufrechterhalten. Einmal wöchentlich erfolgte das Umsetzen der Mäuse in saubere Käfige während der Dunkelphasen. Im Folgenden wird die Standardhaltung auch mit SH abgekürzt.

2.3.2 *Enriched Environment*

Im Alter von zwei Monaten wurden weibliche Mäuse aus den IVCs in 55 cm x 34 cm x 20 cm große Käfige, die normalerweise für die Haltung von Ratten vorgesehen sind, verbracht. Hierbei wurden die bereits bestehenden Tiergruppen mit einer Gruppengröße von 4-5 Individuen beibehalten. Der Zeitpunkt für den Beginn des EE wurde deswegen gewählt, da aus vorangegangenen Arbeiten bereits feststand, dass Tg4-42_{hom}-Tiere im Alter von zwei Monaten noch keine messbaren Verhaltensdefizite oder signifikanten Untergang von Neuronen zeigen. Zusätzlich zu den oben genannten Nistmaterialien erhielten die Mäuse zusätzliche Gegenstände zur Interaktion. Die Ausstattung pro Käfig bestand aus einem vertikalen und einem horizontalen Laufrad, die sich durchgehend in den Käfigen befanden. Neben diesem festen Bestandteil der Käfigausstattung wurden einige andere Gegenstände intermittierend angeboten, wie z. B. Tunnel, Häuser und bunte Spielsteine. Die Interaktion mit diesen Gegenständen war den Tieren ungehindert möglich. Es bestand ebenfalls ein jeweils 12-stündiger Tag-Nachtzyklus. Einmal pro Woche erfolgte während der Dunkelphasen die Reinigung der Käfige. Gleichzeitig wurde die Position der Laufräder innerhalb der Käfige verändert, die anderen Gegenstände wurden nach dem Zufallsprinzip aus den Käfigen entfernt oder neu hinzugefügt. Hierdurch wurden den Tieren im Vergleich zur Haltung in den IVCs regelmäßig neue kognitive Reize präsentiert und eine gesteigerte körperliche Aktivität ermöglicht.

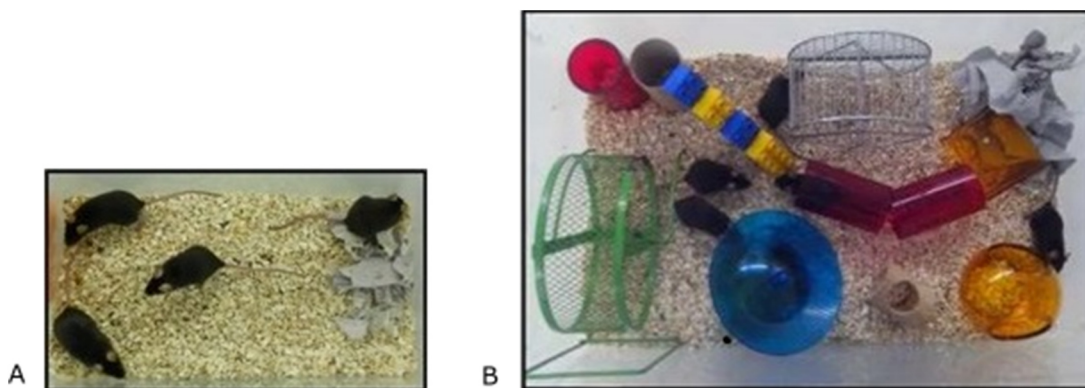


Abbildung 6: Tierhaltungsbedingungen im Vergleich. (A) Beispiel für Standardhaltung. Die Versuchstiere wurden von Geburt an in 33 cm x 18 cm x 14 cm großen IVC gehalten. Zur Unterlage in Form von Tierstreu wurde den Mäusen Zellstoff angeboten. Die Wasser- und Nahrungsaufnahme erfolgte *ad libitum*. (B) Im Alter von zwei Monaten wurden die Tiere in 55 cm x 34 cm x 20 cm große Käfige überführt. Deutlich zu erkennen ist hier die erweiterte Käfigausstattung mit Laufrädern und -tellern sowie wechselnden zusätzlichen Gegenständen, hier z. B. Tunnel und Bausteinen (modifiziert nach Hüttenrauch et al. (2016a), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature publishing group)

2.4 Genotypisierung

Um sicherzustellen, dass alle in dieser Arbeit getesteten Mäuse Träger des A β 4-42-Transgens waren, wurden sie vor Beginn der Versuche noch einmal mittels PCR genotypisiert. Die hierbei verwendete DNS wurde aus den Biopsien der Schwanzspitzen der Mäuse gewonnen, die kurz nach deren Geburt durchgeführt worden waren.

2.4.1 DNS-Isolierung

Zunächst wurde die Schwanzspitzenbiopsie in ein Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben und 400 μ l Lysepuffer (s.u.) hinzugefügt. Die Probe wurde nun für mindestens 20 Stunden bei einer Temperatur von 55 °C in einem „Thermomixer Compact“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 400 U/min inkubiert. Ziel war die vollständige Lyse des Biopsiegewebes. Anschließend erfolgte eine Trennung der festen und flüssigen Phasen bei 17000 U/min über einen Zeitraum von 20min in einer Zentrifuge (Heraeus Biofuge® Stratos, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Der flüssige Überstand wurde nun in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), das bereits 400 μ l auf 4 °C gekühltes Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) enthielt, überführt. Die Probe wurde kurz auf einem Strudelmischer (Vortex

Genie 2®), Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) gemischt, bis das DNS-Präzipitat sichtbar wurde. Im Anschluss wurde das Präparat für 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Das so erhaltene Pellet wurde mit 400 µl 70% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Nun wurde der flüssige Überstand verworfen und etwaige im Gefäß verbliebene Ethanolreste vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde bei einer Temperatur von 55 °C für zwei Stunden getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 55 µl demineralisiertem Wasser gelöst, für eine halbe Stunde auf 55 °C erwärmt und bei 4 °C gekühlt gelagert.

Lysepuffer: 200 mM Tris/HCl pH 8.5 (Carl Roth), 0,2 % Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS; Biomol, Hamburg, Deutschland), 10 mM EDTA (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 200 mM NaCl (Carl Roth), 5 µl Proteinase K (20 mg/ml; Peqlab, Erlangen, Deutschland)

2.4.2 Bestimmung der DNS-Konzentration

Am folgenden Tag wurden die DNS-Konzentrationen der Proben mittels eines Photometers (BioPhotometer®, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden 2 µl der gelösten DNS mit 78 µl demineralisiertem Wasser in einer 220 – 1600nm Küvette (UVette®, Eppendorf) vermischt. Als Nullprobe wurden 80 µl Reinstwasser verwendet. Zur Durchführung einer Vervielfältigung der DNS mittels PCR (s.u.) wurde nach Bestimmung der DNS-Konzentrationen eine Probenverdünnung von 20 ng/µl hergestellt.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung der DNS mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden 2 µl der gelösten DNS mit einem Mastermix bestehend aus 2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs; Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA), 1,6 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 10x Reaktionspuffer (Axon, Kaiserslautern, Deutschland), 10,2 µl Wasser, 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Axon) sowie jeweils 1 µl der beiden Primer Aβ₃₋₄₂ for2 (5'3'-Sequenz GTGACTCCTGACCTTCCAG) beziehungsweise Aβ₃₋₄₂ rev2 (5'3'-Sequenz GTTACGCTATGACAACACC) vermischt (Hersteller beider Primer: Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland). Die eigentliche PCR erfolgte in einem Thermocycler (LabCycler®, SensoQuest, Göttingen, Deutschland) nach dem in Tabelle 1 dargestellten Protokoll.

Tabelle 1: PCR-Protokoll

Durchgang	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1	94	180
2	94	45
3	58	60
4	72	60
	35 Wiederholungen der Durchgänge 1 bis 4	
5	72	30
6	4	∞

2.4.4 Gelelektrophorese

Die wie unter Punkt 2.4.3 mittels PCR vervielfältigte DNS wurde anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurde zunächst ein Trägergel hergestellt. 160 ml Wasser, 40 ml 5x TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) und 4g Agarosepulver (Lonza, Basel, Schweiz) miteinander vermischt und in einer Mikrowelle bei 600 W aufgeköcht. Anschließend wurde als DNS-bindender Farbstoff 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt und mithilfe eines 20-zahnigen Gelkammes etwaige im Gel verbliebene Luftblasen entfernt. Dann wurde das Gel unter Bellassen des Gelkammes zur Polymerisation abgekühlt. Das erhärtete Gel wurde in eine mit TBE-Puffer befüllte Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) gelegt und der Gelkamm entfernt, wodurch sich im Gel ausgesparte Taschen bildeten. Die erste Tasche wurde mit einer 100bp DNS-Leiter (Bioron, Ludwigshafen, Deutschland) gefüllt, die folgenden Taschen wurden mit jeweils 10 µl PCR-Produkt (siehe Kapitel 2.4.3) gemischt mit 1 µl DNS-Ladepuffer (Life Technologies, Carlsbad Kalifornien, USA) beladen. In den letzten beiden Taschen befanden sich eine Negativ- sowie eine Positivprobe für Aβ_{4,42}. Nun wurde eine Spannung von 120V an die Elektrophoresekammer angelegt und die Elektrophorese für ca. 30 Minuten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im Gel Doc 2000 (Bio-Rad) mit der Software Quantity One® (Bio-Rad) unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366nm.

2.5 Gewinnung des murinen Hirngewebes

2.5.1 Perfusion und Kryoprotektion

Zur intrakardialen Perfusion mittels 4% in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffer saline*, PBS, PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) gelöstem Paraformaldehyd (PFA) zur schnellen Fixierung von Hirngewebe wurde zunächst das Perfusionspumpensystem Ismatec® ISM861 (IDEX, Lake Forest, Illinois, USA), bestehend aus einem Pumpenrad und einem Schlauch aufgebaut. An eines der Schlauchenden wurde eine sterile Injektionskanüle (Sterican® 0,9 x 70 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) angebracht. Anschließend wurde die Konstruktion mit gekühltem 0,01 M PBS vollständig gespült, um Luft aus dem Schlauchsystem zu entfernen.

Zur Anästhesie der Mäuse wurde eine Mischung aus Ketamin (Medistar, Ascheberg, Deutschland), Xylazin (Ecuphar, Oostkamp, Belgien) und Reinstwasser für Injektionszwecke (Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet und mittels intraperitonealer Injektion durch eine Feindosierungsspritze (Omnican® F, Braun) verabreicht. Die Tiefe der Anästhesie wurde durch Beobachtung von Reflexantworten auf Schmerzreize mittels einer Pinzette getestet. Ein Ausbleiben der Reflexe zeigte eine ausreichende Sedierungstiefe an. Nun wurden die betäubten Mäuse auf einer Styroporunterlage fixiert. Das Abdomen wurde mithilfe einer chirurgischen Schere eröffnet und das Zwerchfell vorsichtig eingeschnitten, um einen Zugang zum Thorax zu ermöglichen. Anschließend wurde die anteriore Brustwand mitsamt den Rippen mittels einer kleinen Schere und einer Pinzette entfernt und so das schlagende Herz freigelegt. Die Kanüle der Perfusionspumpe wurde nun vorsichtig in den linken Ventrikel eingeführt, zudem wurde der rechte Vorhof des Herzens durch einen kleinen Schnitt geöffnet, um einen Abfluss des Blutes zu gewährleisten. Nun wurden das Herz und die Gefäße der Maus mit ca. 50 ml gekühltem 0,01M PBS perfundiert und so das gesamte Blut aus dem kardiovaskulären System entfernt. Anschließend erfolgte die Perfusion mit gekühltem 4% Paraformaldehyd (PFA; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Nach der Perfusion wurde die Maus von der Styroporunterlage entfernt und auf eine eisgekühlte Unterlage gelegt. Der Kopf wurde mittels einer großen chirurgischen Schere vom Körper getrennt und die Haut über dem knöchernen Schädel geöffnet. Die Schädeldecke wurde mithilfe einer kleinen Schere in zwei Hälften eingeschnitten und vorsichtig eröffnet, anschließend wurden die nun losen Schädelplatten mit einer feinen Pinzette entfernt. Das Gehirn wurde mittels eines kleinen Spatels aus der Schädelgrube gehoben. Anschließend erfolgte die Trennung der Gehirnhälften durch einen longitudinalen Schnitt eines chirurgischen Skalpells. Die linke Hirnhälfte wurde zunächst über Nacht bei 4 °C in 10 ml

PFA gelagert. Am nächsten Tag wurde die Hirnhemisphäre zur Kryoprotektion in 10 ml 30% Saccharose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst in 0,01M PBS überführt und mehrere Tage bei 4 °C gelagert, bis das Gewebe auf den Boden des Behälters gesunken war. Anschließend wurde die Gehirnhälfte aus der Saccharoselösung entfernt und auf Trockeneis gefroren. Die weitere Lagerung erfolgte tiefgekühlt bei -80 °C.

2.5.2 Herstellung der Hirngewebeschnitte

Zur Quantifizierung der Neuronen wurden Gehirnschnitte mit Kresylviolett gefärbt. Hierzu wurden die durch Perfusion mit PFA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixierten Hirnhemisphären wie unter 2.5.1 beschrieben verwendet. Das Cerebellum sowie der frontale Kortex wurden mithilfe eines chirurgischen Skalpells entfernt. Anschließend wurde das Hirngewebe mittels Tissue-Tek® O.C.T. Compound Einbettmedium (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf einem Probensockel aus Metall fixiert und vollständig mit Kleber ummantelt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich keine Blasen innerhalb des Einbettmediums bildeten. Der Metallsockel wurde nun in eine Kryostathalterung (CM1850 UV, Leica, Wetzlar, Deutschland) eingespannt und 30 µm dicke Schnitte in der koronalen Ebene der Hirnhemisphären hergestellt. Als Klappen kamen Mikrotomklappen des Typs C35 (Feather, Osaka, Japan) zum Einsatz. Die Hirnschnitte wurden alternierend auf zehn Glasbehälter verteilt, sodass sich jeder zehnte Schnitt in einem Behälter befand. Es wurde das gesamte Gewebe geschnitten und auf die Glasbehälter verteilt. Die Glasbehälter wurden vor der Färbung mit Kresylviolett bei einer Temperatur von -80 °C gekühlt gelagert.

2.6 Bestimmung der Neuronenzahl im CA1

2.6.1 Färbung der Gewebeschnitte mittels Kresylviolett

Zur Färbung der Hirnschnitte mit Kresylviolett wurde pro untersuchtes Tier jeweils ein Glasbehälter mit Probenmaterial verwendet, sodass eine Serie jedes zehnten Schnitts in die spätere Analyse einbezogen wurde. Zunächst wurde das Probenglas vorsichtig und vollständig mit gekühltem PBS befüllt, sodass sich überschüssiges Klebermaterial auflösen konnte. Anschließend wurde der Inhalt in eine flache mit PBS befüllte Petrischale gegossen. Mithilfe eines feinen Pinsels wurden nun die einzelnen, wie unter 2.5.2 beschrieben, hergestellten Gewebeschnitte auf Objektträger (Superfrost®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgezogen und in einem Trockenschrank bei 37 °C getrocknet.

Zur anschließenden Färbung wurden zunächst drei verschiedene Lösungen hergestellt:

Lösung 1: 13,61g Natriumacetat trihydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden in 100 ml demineralisiertem Wasser (ddH₂O) gelöst, um 1M Natriumacetat herzustellen. Anschließend wurden 40 ml des gelösten Natriumacetats 9,6 ml reine Essigsäure (Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) hinzugefügt. Zuletzt wurde die Lösung mit ddH₂O auf ein Volumen von 1l aufgefüllt.

Lösung 2: Zunächst wurden 20 ml Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 980 ml demineralisiertem Wasser gemischt und die entstandene Lösung für eine Stunde gerührt. Anschließend wurden 2,5 ml dieser Lösung mit 150 ml 100% Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 50 ml ddH₂O gemischt.

Lösung 3: Zur Herstellung der Färbelösung wurde 0,1 g Kresylviolettacetat (Fluka, St. Louis, Missouri, USA) in 1l der Lösung 1 gelöst und für mindestens 30 Minuten gerührt.

Zur Entfernung von Lipiden wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten zunächst mithilfe eines Färbegestelles nacheinander für jeweils 10 Minuten in zwei mit Lösung 1 gefüllten Färbewannen inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 Minuten in einer Färbewanne mit Lösung 2 und zwei weitere Inkubationsschritte für jeweils 10 Minuten in Lösung 1. Die eigentliche Färbung der Schnitte erfolgte für jeweils 8 Minuten in zwei Färbewannen, die mit der Färbelösung (Lösung 3) befüllt waren. Die Dehydrierung der Gewebeschnitte erfolgte dreimal für jeweils eine Minute in Lösung 1, drei Minuten in 100 % Ethanol, 10 Minuten in Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und abschließend zweimal fünf Minuten in Xylol (Carl Roth). Zuletzt wurden die Objektträger mit dem Einschlussmittel Roti®-Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) benetzt und mit einem Deckgläschen (Menzel-Gläser 24 x 60 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bedeckt. Die Objektträger mit den gefärbten Schnitten wurden lichtgeschützt aufbewahrt.

2.6.2 Stereologie

Die Anzahl der Neuronen wurde in der Zellregion CA1 des Hippocampus proprius bestimmt. Hierzu wurden die mit Kresylviolett gefärbten Gewebeschnitte (siehe Abschnitt 2.6.1) einer objektiven stereologischen Zählung unterzogen. Es kam ein Auflichtmikroskop mit automatisch beweglichem Objektisch des Modells BX 51 (Olympus, Shinjuku, Japan) sowie die das Programm Stereo Investigator 7 (MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) zum Einsatz. In den nach o.g. Verfahren präparierten Gewebeschnitten wurden zunächst unter einer vierfachen Vergrößerung die CA1-Region des Hippocampus im Bregma von

-1,22 mm bis -3,80 mm identifiziert (Paxinos und Franklin 2013) und der Zählbereich softwarebasiert ausgewählt. Anschließend wurde auf eine hundertfache Vergrößerung gewechselt. Nun wurden die Neuronen innerhalb mehrerer Zählraster von $14\ \mu\text{m} \times 14\ \mu\text{m}$, die zufällig innerhalb eines Probenrasters mit einer Größe von $49\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ ausgewählt wurden, gezählt. Es wurden die Grundprinzipien der design-basierten Stereologie verwendet (West et al. 1991; Schmitz und Hof 2005). Hierzu wurde die mikroskopischen Schnitte gefächert und alle scharf sichtbaren Zellkerne nach den Zählregeln, die in Abbildung 7 erläutert werden, markiert. An jeder Zählposition wurde die Schnittdicke bestimmt mit einer *dissector height* von $5\ \mu\text{m}$. Anhand der *optical dissector*- Methode und der *optical fractionator*-Methode mit einer *top guard zone* von $2\ \mu\text{m}$ (West et al. 1991) wurde die Gesamtzahl der Neurone eines einzelnen mikroskopischen Gewebeschnittes ermittelt. Im Anschluss wurde die Gesamtzahl der Neurone berechnet. Hierzu kamen die Formeln 1) 2) und 3) zum Einsatz. Die vollständigen Parameter für die stereologische Analyse sind in Tabelle 3 angegeben. Alle Gewebeschnitte wurden vor dem stereologischen Zählverfahren verblindet, um einen untersucherabhängigen Einfluss zu unterbinden.

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

$$2) N_{\text{Schnitt}} = P \times Q$$

$$3) N_{\text{gesamt}} = \sum_{i=1}^n N_{\text{Schnitt } i}$$

Tabelle 2: Erläuterungen

Abkürzung	Erläuterung
asf	<i>area sample fraction</i> $\frac{\text{Fläche Probenraster } [\mu\text{m}^2]}{\text{Fläche Zählraster } [\mu\text{m}^2]}$
ssf	<i>section sampling fraction</i> (Anzahl der gezählten Schnitte, siehe 2.5.2 und 2.6.1)
tsf	<i>thickness sampling fraction</i> $\frac{\text{Schichtdicke } [\mu\text{m}]}{\text{optical dissector height } [\mu\text{m}]}$
Q	<i>Total markers counted</i> (von Software ermittelt)
N_{Schnitt}	Neuronenzahl eines einzelnen Schnitts
N_{gesamt}	Gesamtneuronenzahl in der Region CA1

Tabelle 3: Stereologieparameter

Parameter	Wert
Probenraster x [μm]	49
Probenraster (y) [μm]	105
Fläche Probenraster (xy) [μm^2]	5145
Zählraster (x) [μm]	14
Zählraster (y) [μm]	14
Fläche Zählraster (xy) [μm^2]	196
asf	26,25
Ssf	10
<i>optical dissector height</i> [μm]	5

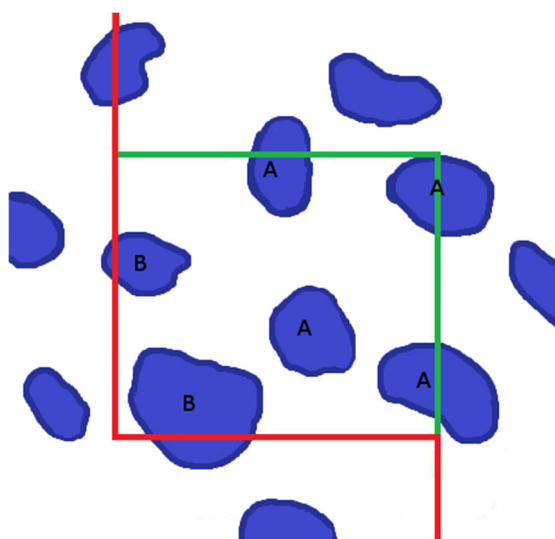


Abbildung 7: Zählregeln. Vereinfachte Darstellung der Sicht durch das Mikroskop während des stereologischen Zählvorgangs. Es werden nur scharfe Zellkerne (blau) gezählt, die sich in dem $14 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$ großen Zählraster befinden, oder die grünen Linien schneiden (A). Zellkerne, die die roten Linien schneiden (B) oder sich außerhalb des Zählrasters befinden, werden nicht gezählt.

2.7 Motorik- und Verhaltenstests

Zum Abschätzen von Funktionen der Motorik und des Gedächtnisses wurde eine Reihe an Verhaltenstests durchgeführt. Die motorischen Fähigkeiten wurden durch den *String Suspension Test* und den *Balance Beam Test* überprüft, Gedächtnisfunktionen wurden mithilfe des *Cross Maze Tests* und des *Morris Water Maze Tests* untersucht. Es wurden keine geschlechterbezogenen Einschränkungen vorgenommen. Während eines Tages wurde jede Maus höchstens einem motorischen und einem Verhaltenstest unterzogen.

2.7.1 *String Suspension Test*

Der *String Suspension Test* wurde zum Abschätzen von motorischer Koordination und Greifkraft der Mäuse verwendet. Hierzu wurde eine 50 cm lange Baumwollschnur mit 2 mm Durchmesser in 30 cm Höhe zwischen zwei Holzstangen straff gespannt. Der Boden unter dem Aufbau wurde gepolstert. Die Mäuse wurden nun an den Vorderpfoten in die Mitte der Schnur platziert. Anhand eines 5-Punkte-Systems wurden die Halte- und Kletterbewegungen entlang der Schnur bewertet (Tabelle 4; Moran et al. 1995; Arendash et al. 2001). Jede Maus wurde während eines Tages in drei 60 Sekunden dauernden Durchgängen getestet, zwischen denen jede Maus mindestens 10 Minuten Zeit zur Erholung bekam. Abschließend wurde der Mittelwert der Ergebnisse der einzelnen Durchgänge gebildet. Zur Eliminierung von eventuellen Gerüchen, an denen sich die Mäuse hätten orientieren können, wurde die Baumwollschnur zwischen jedem einzelnen Versuch mit 70 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt.

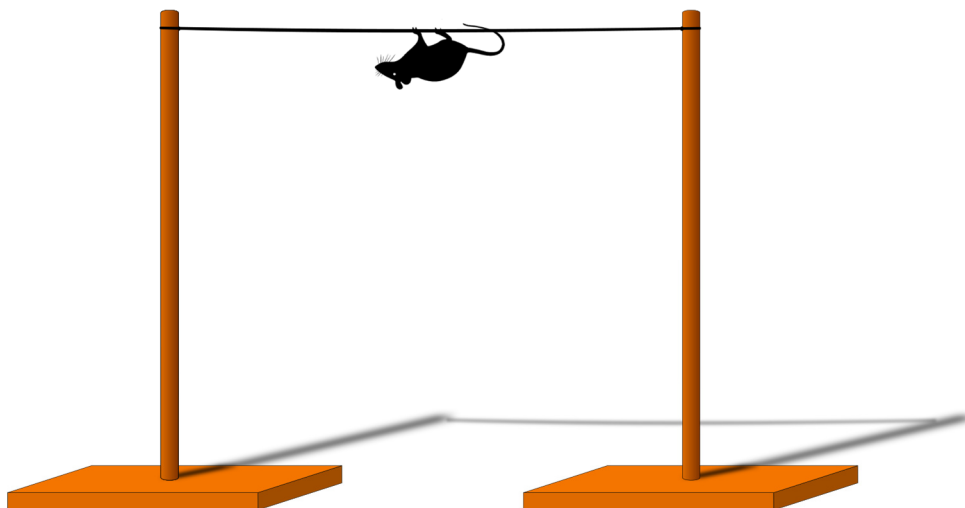


Abbildung 8: Versuchsaufbau *String Suspension Test*. Die Versuchstiere werden einzeln an den Vorderpfoten an einer in ca. 50 cm Höhe zwischen zwei Holzstangen gespannten Baumwollschnur platziert. Die Halte- und Kletterbewegungen werden anschließend über einen Zeitraum von 60 Sekunden anhand des in Tabelle 4 angegebenen Punktesystems bewertet. Insgesamt werden 3 Durchgänge pro Versuchstier durchgeführt.

Tabelle 4: Bewertung der Halte- und Kletterbewegung im *String Suspension Test*

Punkte	Beschreibung
0	Maus fällt von der Schnur
1	hängt passiv an Vorder- oder Hinterbeinen an der Schnur
2	hängt an Vorder- oder Hinterbeinen an Schnur und versucht auf Schnur zu klettern
3	hängt an Vorder- und Hinterbeinen an Schnur, ohne sich zu bewegen
4	Hängt an allen vier Beinen und Schwanz an Schnur und bewegt sich
5	Erreicht das Ende der Schnur und berührt eine der Holzstangen

2.7.2 *Balance Beam Test*

Zur weiteren Einschätzung der feineren motorischen Koordinationsfähigkeiten der getesteten Mäuse wurde der *Balance Beam Test* verwendet (Luong et al. 2011). Der Versuchsaufbau bestand hier aus zwei hölzernen 44,5 cm hohen Pfeilern, zwischen denen ein Stab aus Holz mit 1 cm Durchmesser angebracht worden war. An beiden Enden des Stabes befand sich jeweils eine 15 cm x 9 cm große hölzerne Plattform. Die Unterlage unterhalb der Konstruktion wurde gepolstert, um mögliche Verletzungen zu vermeiden. Während eines Probedurchlaufs wurden die Mäuse auf dem Stab platziert, um sich an den Test zu gewöhnen. Über drei Durchgänge, die während eines Tages stattfanden, wurde die Fähigkeit jeder Maus bestimmt, sich entlang des Stabes zu bewegen. Jeder Durchgang dauerte maximal 60 Sekunden mit mindestens 10 Minuten Erholungszeit zwischen den einzelnen Durchgängen. Zur Bewertung wurde die auf dem Stab verbrachte Zeit gemessen. Erreichte eine Maus während eines Durchganges eine der Plattformen am Ende des Stabes, so erhielt sie die vollen 60 Sekunden als Score. Auch hier wurde der Mittelwert der einzelnen Durchgänge gebildet. Zwischen jedem einzelnen Versuch wurden die Stange und die Plattformen mit 70 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt, um Gerüche zu entfernen, die die Tiere beeinflussen könnten.

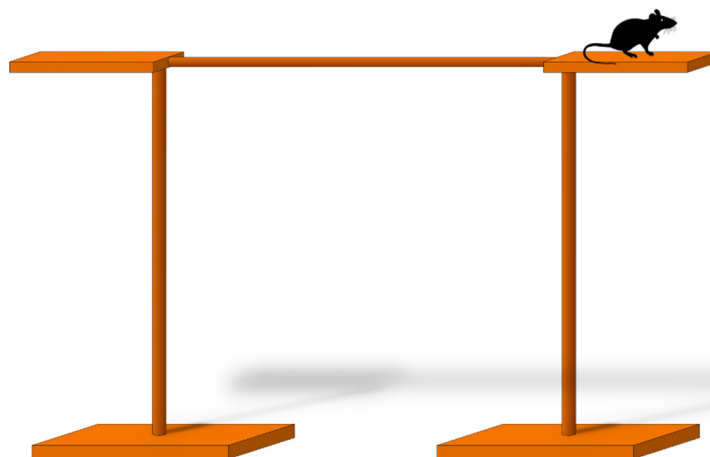


Abbildung 9: Versuchsaufbau *Balance Beam Test*. Die Versuchstiere werden einzeln in die Mitte eines Holzstabs mit 1 cm Durchmesser platziert, der zwei 9 x 15 cm große hölzerne Plattformen in 44,5 cm Höhe miteinander verbindet. Anschließend wird die Zeit gemessen, die die Tiere auf dem Stab verbringen (maximal 60 Sekunden). Erreicht die Maus eine der Plattformen, so werden die vollen 60 Sekunden gewertet. Es werden pro Versuchstier je drei Durchgänge durchgeführt.

2.7.3 *Morris Water Maze Test*

Das räumliche Lernen und das räumliche Bezugsgedächtnis wurde mithilfe des *Morris Water Maze Tests* (MWM) analysiert (Morris 1984). Der Grundaufbau bestand aus einem kreisrunden Metallbecken mit einem Durchmesser von 110 cm, das vollständig mit Wasser gefüllt worden war. Das Wasser wurde mittels einer ungiftigen weißen Farbe eingefärbt, die Wassertemperatur wurde durchgehend auf 20 °C (+/- 2 °C) gehalten. Unter der Wasseroberfläche befand sich eine mobile Plattform, deren Position im Wasserbecken beliebig verändert werden konnte und die aufgrund ihrer weißen Farbe im Wasser nicht zu sehen war. Die Höhe des Wasserspiegels wurde so gewählt, dass sich die Mäuse sicher auf der Plattform aufhalten konnten, ohne diese von der Wasseroberfläche aus zu sehen. Um das Becken herum wurden ebenfalls weißgefärbte Kunststoffvorhänge angebracht, um Ablenkung oder eine Orientierung durch unbeabsichtigte Hinweisreize innerhalb des Raumes zu verhindern. Das Wasserbecken wurde in vier gedachte, gleich große Quadranten eingeteilt (*right, left, target, opposite*). Über dem Becken befand sich eine Kamera (CBC, Commack, New York, USA), mit der die Schwimmbewegungen sowie die Position der Tiere aufgezeichnet wurden. Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte mithilfe der Video-Tracking-Software „Any-Maze“ (Stoelting Co, Wood Dale, Illinois, USA). Der eigentliche neuntägige MWM bestand aus drei kleineren Testabschnitten: Dem sog. *Cued Training*, dem *Acquisition Training*, sowie dem abschließenden *Probe Trial*. Jedes Tier musste diese Abschnitte vollständig durchlaufen. Mäuse, die aufgrund von körperlichen Einschränkungen Defizite im Schwimmverhalten zeigten, wurden nicht weiter analysiert.

2.7.3.1 *Cued Training*

Die ersten drei Tage des Versuches bestanden aus dem sog. *Cued Training*. Dieser Teil diente dazu, die Tiere an den Versuchsaufbau und besonders die unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform zu gewöhnen und die intakte visuelle Wahrnehmung der Tiere zu überprüfen. Hierzu wurde diese in der Mitte eines der vier Quadranten positioniert und mit einer blauen Markierung versehen, die von jeder Position im Wasserbecken sichtbar war. Die Mäuse wurden nun nacheinander vorsichtig an der Schwanzwurzel gegriffen und am Rand des der Plattform gegenüberliegenden Quadranten in das Wasser gesetzt. Die eigentliche Testdauer betrug eine Minute. Die Tiere, die die Plattform selbständig gefunden hatten, wurden dort für ca. 10 Sekunden sitzen gelassen, die anderen wurden durch den Experimentator vorsichtig und ruhig mit der Hand zur Plattform geführt. Nach jedem Versuch wurden die Mäuse vorsichtig mit Zellstoff abgetupft und für mindestens zwei Minuten unter einer Wärmelampe getrocknet. Während eines Tages durchlief jede Maus vier solcher Versuchseinheiten. Vor jeder neuen Einheit wurde die Position der Plattform und des Quadranten, in dessen Rand die Tiere ins Wasser gesetzt wurden, verändert (Tabelle 5). Zwischen den einzelnen Test konnten die Tiere für mindestens 15 Minuten pausieren. Die während des *Cued Trainings* aufgezeichneten und ausgewerteten Parameter enthielten die Schwimgeschwindigkeit sowie die Zeit, die zum Auffinden der Plattform benötigt wurde.

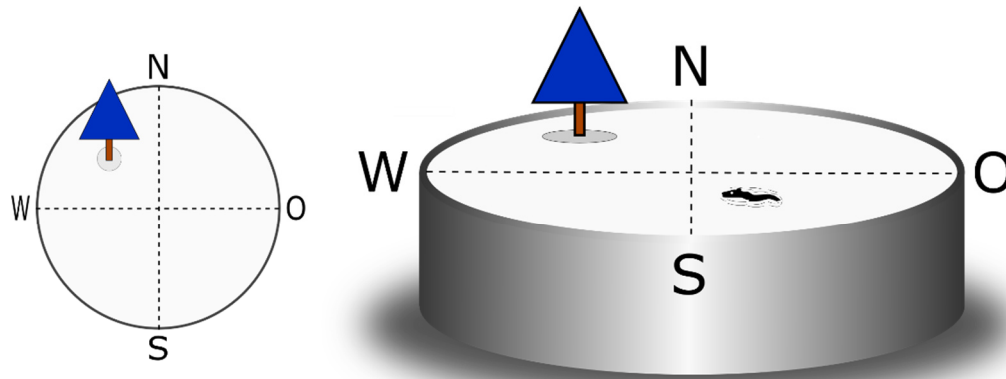


Abbildung 10: Versuchsaufbau MWM, Cued Training. Draufsicht und perspektivische Darstellung. Das *Cued Training* dient dazu, die Mäuse mit dem Versuchsaufbau vertraut zu machen. In der Mitte eines von vier gleichgroßen Quadranten wird eine sich knapp unter der Wasseroberfläche befindliche Plattform positioniert und mit einer blauen Markierung versehen. Aufgrund des weiß gefärbten Wassers ist nur die Markierung sichtbar, die Plattform selbst bleibt unter der Oberfläche verborgen. Die Versuchstiere werden einzeln am Rand des der Plattform gegenüberliegenden Quadranten ins Wasser gesetzt. Anschließend erhalten sie eine Minute Zeit, die Plattform zu finden. Hat das Tier die Plattform gefunden, so wird es dort für 10 Sekunden sitzen gelassen, ansonsten wird es zunächst mit der Hand zur Plattform geführt. Insgesamt werden pro Tier 4 Durchgänge innerhalb eines Tages durchgeführt. Zwischen jedem Durchgang erhält das Tier mindestens 15 Minuten Ruhezeit. Die Positionen der Plattform (Ziel) und der entsprechende Startquadrant für jeden Durchgang sind in

Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Start- und Zielpositionen im *Cued Training*

	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3		Durchgang 4	
	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel
Tag 1	N	SO	O	NO	S	SW	W	SO
Tag 2	S	NO	N	NW	W	NO	O	SO
Tag 3	W	NW	S	SO	O	SW	N	SW

2.7.3.2 *Acquisition Training*

Das sogenannte *Acquisition Training* begann 24 Stunden nach Abschluss des *Cued Trainings*. Hierzu wurden am Rand des Wasserbeckens vier nahe Hinweisreize in Form farbiger Markierungen angebracht. Die zuvor weißen Kunststoffvorhänge um das Becken herum wurden ebenfalls farbig markiert und boten den Tieren weitere Hinweise zur Orientierung, während die Markierung auf der Plattform stattdessen entfernt wurde. Wie oben beschrieben wurden die Mäuse am Rand des Beckens vorsichtig ins Wasser gesetzt und ihnen 60 Sekunden Zeit gegeben, die nun komplett unsichtbare Plattform zu finden. Scheiterten sie an dieser Aufgabe, so wurden sie vorsichtig per Hand zur Plattform geleitet. Wie beim *Cued Training* wurden die Tiere für 10 Sekunden auf der Plattform belassen, bevor sie aus dem Becken entfernt wurden. Anschließend wurden sie wie oben beschrieben mit Zellstoff abgetupft und unter einer Wärmelampe getrocknet. Das *Acquisition Training* wurde über fünf Tage durchgeführt. Während dieser Zeit durchlief jede Maus vier Versuchsdurchläufe pro Tag. Zwischen jedem Durchlauf bestanden fünfzehnminütige Ruhephasen. Während des gesamten *Acquisition Trainings* wurde lediglich die Position verändert, an der die Tiere ins Wasser gesetzt wurden, die Plattform befand sich durchgehend an derselben Position (Tabelle 6). Auch hier wurden die Schwimmgeschwindigkeit und die benötigte Zeit zum Auffinden der Plattform aufgezeichnet.

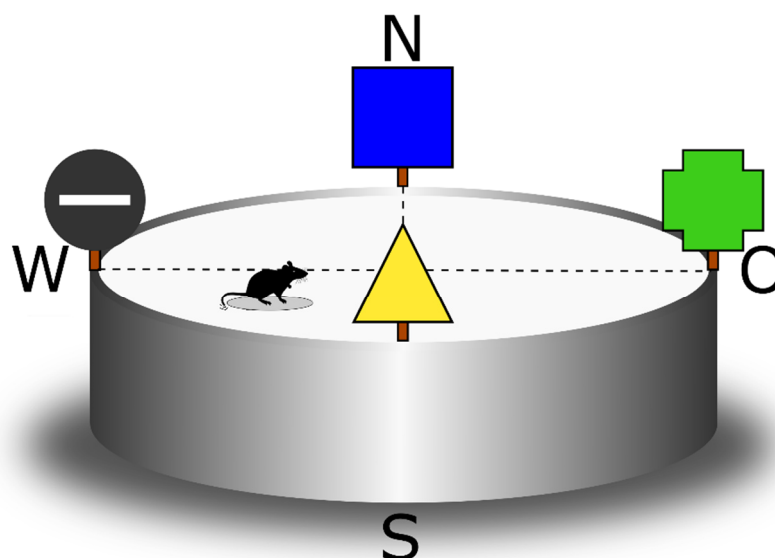


Abbildung 11: Versuchsaufbau MWM, *Acquisition Training*. Im Gegensatz zum *Cued Training* sind nun am Beckenrand vier farbige Markierungen als nahe Hinweisreize angebracht. Ebenso wurden die weißen Kunststoffvorhänge um das Becken herum zur Orientierung farblich markiert (hier nicht abgebildet). Die blaue Markierung der Unterwasserplattform wurde entfernt. Analog zum *Cued Training* werden die Tiere einzeln am Rand am Rand des Wasserbeckens ins Wasser gesetzt und erhalten zum Auffinden der nun komplett unsichtbaren Plattform 60 Sekunden Zeit gegeben. Im Falle eines Scheiterns werden sie vorsichtig per Hand zur Plattform geführt. Wie beim *Cued Training* wurden die Tiere für 10 Sekunden auf der Plattform sitzen gelassen, bevor sie aus dem Becken entfernt wurden. Im Anschluss eines jeden Versuchseinheit erhält das Tier mindestens 15 Minuten Ruhepause. Das *Acquisition Training* wird über fünf Tage durchgeführt mit je vier Durchläufen pro Tag und Tier. Hierbei blieb die Position der Plattform durchgängig gleich, die Startpositionen wurde vor jedem einzelnen Durchgang geändert (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Start- und Zielposition im *Acquisition Training*

	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3		Durchgang 4	
	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel
Tag 1	N	SW	O	SW	SO	SW	NW	SW
Tag 2	SO	SW	N	SW	NW	SW	O	SW
Tag 3	NO	SW	SO	SW	O	SW	N	SW
Tag 4	O	SW	NW	SW	N	SW	SO	SW
Tag 5	N	SW	SO	SW	O	SW	NW	SW

2.7.3.3 Probe Trial

Nach weiteren 24 Stunden wurde der sogenannte *Probe Trial* durchgeführt. Hierzu wurde die Plattform aus dem Wasserbecken entfernt, die Markierungen am Beckenrand und den Vorhängen wurden belassen. Nun wurde jede Maus nacheinander für nur einen einzigen Durchgang am Rande des Quadranten, der sich im *Acquisition Training* gegenüber der Plattform befunden hatte, ins Wasser gesetzt. Während der folgenden 60 Sekunden wurde die Position der Maus bestimmt und die Zeit gemessen, die sich das Tier in den einzelnen Quadranten aufhält. Anschließend wurden Tiere aus dem Wasserbecken gehoben und wie oben beschrieben getrocknet und gewärmt.

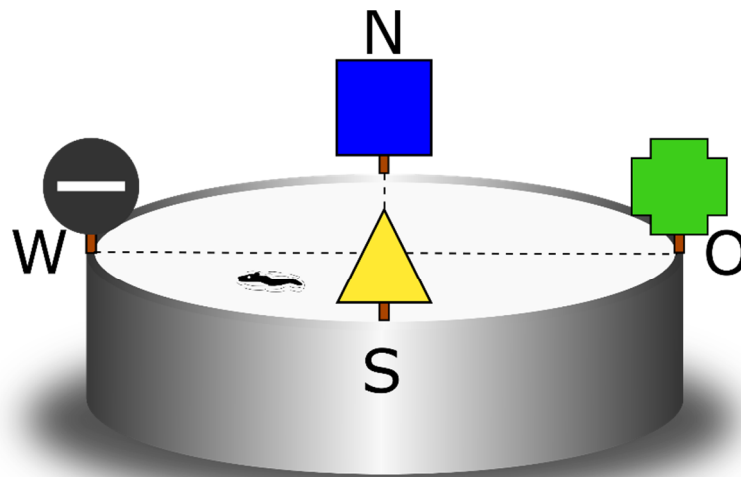


Abbildung 12: Versuchsaufbau MWM, *Probe Trial*. Der *Probe Trial* besteht aus einem einzigen Durchgang. Im Vergleich zum *Acquisition Training* ist im *Probe Trial* die Plattform aus dem Versuchsaufbau entfernt. Die Tiere werden einzeln am Rand des der ehemaligen Plattformposition gegenüberliegenden Quadranten ins Wasser gesetzt. In einem Zeitraum von 60 Sekunden wird die Zeit gemessen, in der sich die Versuchstiere in den einzelnen Quadranten aufhält.

Tabelle 7: Startposition im *Probe Trial*

		Durchgang 1	
		Start	Ziel
Tag 1		NO	-

2.7.4 *Cross Maze Test*

Anhand des Cross Maze Test lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion des Arbeitsgedächtnisses der untersuchten Mäuse ziehen. Hierbei wurde das Erkundungsverhalten der Mäuse beobachtet.

Das für den Versuch verwendete Labyrinth bestand aus vier 30 cm langen und 8 cm breiten und im rechten Winkel zueinander angeordneten Armen. Die Höhe der Wände jedes Armes betrug 15 cm. Boden und Wände der Arme waren einheitlich grau gefärbt, um den Versuchstieren keine Orientierung anhand visueller Hinweise zu ermöglichen. Die zentrale Region, in der sich die vier Arme trafen, war 8 cm x 8 cm groß. Die gesamte Konstruktion wurde unter einer Kamera positioniert.

Nun wurden die Mäuse mit dem Blick zur Wand in das Ende eines zufällig ausgewählten Arms gesetzt. Mithilfe der Video-Tracking-Software „Any-Maze“ (Stoelting Co, Wood Dale, Illinois, USA) wurde während eines 10-minütigen Testintervalls gemessen, wie oft und in welcher Reihenfolge die Arme durch eine Maus besucht wurden. Hierbei war entscheidend, dass die Maus den Arm vollständig mit allen 4 Pfoten betreten hatte. Ein sofortiger erneuter Besuch des Armes wurde als einfaches Betreten gewertet. Wurden alle vier Arme ohne Wiederholung durch eine Maus besucht, so wurde dies als Alternation gewertet (z. B. 3-4-2-1). Zuletzt wurde der Prozentsatz der Alternationen als der Quotient der tatsächlich durchgeführten Alternationen von den während des Tests theoretisch möglichen Alternationen gebildet (entspricht Gesamtanzahl der Armbesuche – 3) (Wietrzych et al. 2005). Gesunde Mäuse erkunden typischerweise die einzelnen Gänge nacheinander und neigen dazu, den zuletzt besuchten Gang zu vernachlässigen und stattdessen einen Gang zu erkunden, dessen Besuch länger zurückliegt (Wietrzych et al. 2005). Nach jedem Test wurde der gesamte Versuchsaufbau mit 70 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt um etwaige Gerüche, die die nachfolgenden Mäuse irritieren bzw. zur Orientierung nutzen könnten, zu entfernen.

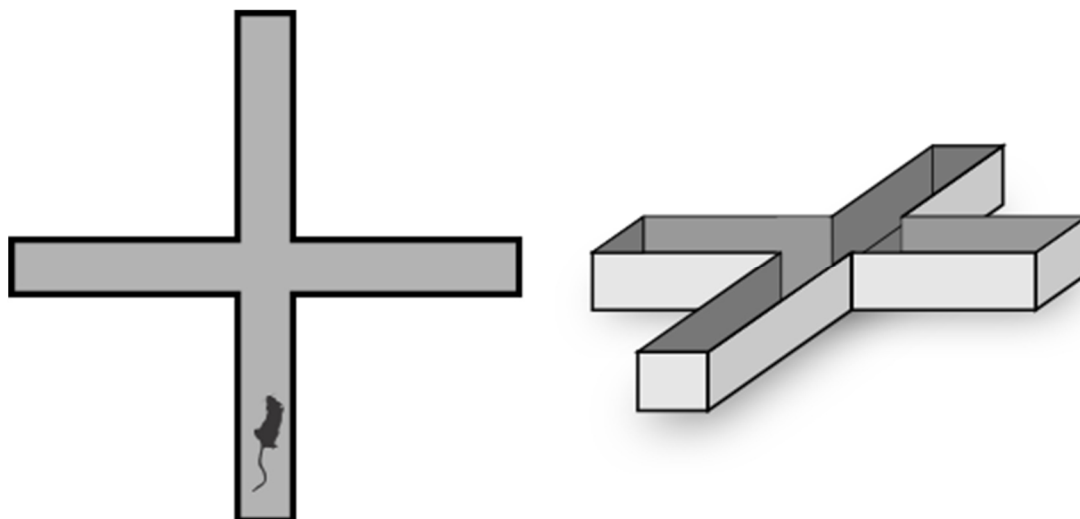


Abbildung 13: Versuchsaufbau *Cross Maze Test*, Draufsicht (A) und perspektivische Darstellung (B). Im *Cross Maze Test* wird das Erkundungsverhalten der Mäuse beobachtet. Der Aufbau besteht aus vier rechtwinklig zueinander angeordneten Armen. Die Versuchstiere werden einzeln mit dem Gesicht zur Wand in das Ende eines zufällig ausgewählten Armes gesetzt. Anschließend wird über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen, wie oft und in welcher Reihenfolge das Tier die einzelnen Arme besucht. Zur Beurteilung des Arbeitsgedächtnisses wird der Quotient der von der Maus durchgeführten Alternationen (Betreten aller vier Arme ohne Wiederholung) von den während des Tests theoretisch möglichen Alternationen gebildet.

2.8 Statistik

Die zum Vergleichen der verschiedenen Testgruppen in den Motor- und Verhaltenstest sowie der stereologischen Analyse verwendeten statistischen Test setzten sich aus Zweistichproben-t-Test, Abhängigen t-Test, sowie der einfaktoriellen und zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur zusammen. Nähere Informationen zu den in den einzelnen Versuchen verwendeten statistischen Analysen werden in den jeweiligen Abschnitten im Ergebnisteil (Kapitel 3) angegeben. Sofern nicht weiter beschrieben, werden folgende Signifikanzniveaus vorausgesetzt: $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$. Sämtliche statistischen Berechnungen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Unter den Legenden der Abbildungen der jeweiligen Testergebnisse werden des weiteren Angaben über die verwendete Stichprobengröße n gemacht. Alle Ergebnisse werden als Durchschnitt $M \pm$ Standardfehler angegeben.

2.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte bzw. Verbrauchsmaterialien wurden während dieser Arbeit verwendet (Tabelle 8):

Tabelle 8: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller
BioPhotometer® (Photometer)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BX 51 Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Shinjuku, Japan
C 35 Mikrotomklingen	Feather, Osaka, Japan
CM 1850 UV Kryostat	Leica, Wetzlar, Deutschland
Gel Doc 2000®	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Heraeus Biofuge® Stratos Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ismatec® ISM 861 Peristaltikpumpe	Idex, Lake Forrest, Illinois, USA
Kleintierkäfige (<i>Individually Ventilated Cages, IVC</i>)	Tecniplast, Hohenpleissberg, Deutschland
LabCycler® (Thermocycler)	SensoQuest, Göttingen, Deutschland
Menzel-Gläser 24 x 60 mm Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Omnican® F 1 ml Feindosierspritze	Braun, Melsungen, Deutschland
Sterican® 0,9x70 mm Injektionskanüle	Braun, Melsungen, Deutschland
Superfrost® Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UVette® 220-1600 nm Küvette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2® (Vortexer)	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

2.10 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in Tabelle 9 aufgelistet:

Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
100bp DNS-Leiter	Bioron, Ludwigshafen, Deutschland
10x Reaktionspuffer	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
DNS-Ladepuffer	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Essigsäure	Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Medistar, Ascheberg, Deutschland
Kresylviolettacetat	Fluka, St. Louis, Missouri, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Biomol, Hamburg Deutschland
Natriumtriaetatrihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>phosphate buffer saline</i> , PBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Proteinase K	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Reinstwasser	Braun, Melsungen, Deutschland
Roti®-Histokit	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T. Einbettmedium	Sakura Finetek, Alpen aan den Rijn, Niederlande
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin	Ecuphar, Oostkamp, Belgien
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.11 Software

Folgende Software wurde zum Erfassen der Daten und zum Erstellen dieser Dissertation verwendet (Tabelle 10):

Tabelle 10: Verwendete Software

Software	Hersteller
ANY-Maze	Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA
GIMP v.2.8.18	The GIMP Development Team
GraphPad PRISM v5.01	GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA
Inkscape v1.0	Inscape.org
Lucidchart	Lucid Software, South Jordan, Utah, USA
Microsoft Word 2019	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Quantity One	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des Tg4-42-Transgens bei allen untersuchten Tieren

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen zu Motorik, Verhalten und Anzahl der Neuronen in der Pyramidenzellregion CA1 musste zunächst verifiziert werden, dass das Tg-4-42-Transgen im Erbgut aller für diese Arbeit verwendeten Mäuse vorliegt. Hierzu wurde aus Schwanzspitzenbiopsien, die den Mäusen direkt nach der Geburt entnommen wurden, die DNS isoliert und mittels anschließender Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen Primern vervielfältigt. Dann wurde in der Gelelektrophorese das Genmaterial aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit jeweils einer Positiv- und Negativprobe für A β 4-42 verglichen. Abbildung 14 zeigt ein Beispielbild dieser Untersuchungen. In den Proben aller für diese Arbeit ausgewählten Mäuse konnte A β 4-42 nachgewiesen werden (Abbildung 14). Somit sind alle Mäuse Träger des Tg4-42-Transgens.

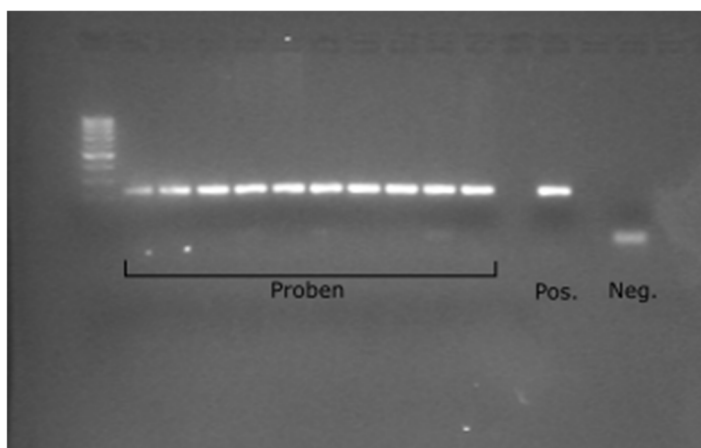


Abbildung 14: Beispiel für Nachweis von A β 4-42 mittels Gelelektrophorese. In den Proben des Genmaterials aller verwendeten Mäuse konnte das von Mäusen des Typs Tg4-42 exprimierte A β 4-42-Transgen nachgewiesen werden. Pos. = Positivprobe, Neg. = Negativprobe.

3.2 Motortests

3.2.1 Homozygote Mäuse des Typs Tg4-42 zeigen keine Verluste ihrer motorischen Fähigkeiten in den untersuchten Altersgruppen

Zur genaueren Betrachtung der motorischen Entwicklung bei homozygoten Trägern (Tg4-42_{hom}) im Laufe des Lebens wurden die drei Testgruppen (n = 9 - 17) im Alter von jeweils fünf, sechs und sieben Monaten, untersucht. Hierzu kamen der unter 2.7.1 beschriebene *String Suspension Test* sowie der *Balance Beam Test* (siehe 2.7.2) zur Anwendung. Im *String Suspension Test* wurde die Bewegung der Mäuse entlang einer gespannten Schnur mittels eines Scores von 1 bis 5 bewertet. Hier erzielten alle Gruppen durchgehend hohe Werte, die im Altersverlauf nicht abnahmen, sondern eher anstiegen (**5M**: M = 3,313 ± 0,4446; **6M**: M = 4,118 ± 0,225; **7M**: M = 4,333 ± 0,3727). Zwischen den einzelnen Altersgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15 A).

Im *Balance Beam Test* zeigte sich ein ähnliches Bild. Hierbei wurde die Zeit gemessen, die sich die Mäuse auf einem in 44,5 cm Höhe waagrecht angebrachten Stab halten konnten. Auch hier erzielten die Mäuse im Alter von fünf bzw. sechs Monaten durchweg hohe Zeiten (**5M**: M = 50,46 s ± 4,015; **6M**: M = 50,43 s ± 3,827), während Mäuse im Alter von sieben Monaten etwas weniger lang auf dem Stab halten konnten (**7M**: M = 36,56 s ± 5,812). Ein statistischer Vergleich der drei Gruppen untereinander ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15 B). Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass es bei Tg4-42-Mäusen zu keinen altersabhängig zunehmenden Einschränkungen der Motorik kam, wobei hier kein Vergleich mit einer Kontrollgruppe bestehend aus Wildtyptieren durchgeführt wurde. Aufgrund einer motorischen Einschränkung musste ein Tier der sechs Monate alten Gruppe aus den Motoriktests und (bei daraus resultierender Unfähigkeit zu schwimmen) dem MWM entfernt werden. Das Laufen auf waagrechtem Untergrund war nicht beeinträchtigt, sodass im *Cross Maze Test* die Altersgruppe entsprechend um ein Tier größer ist.

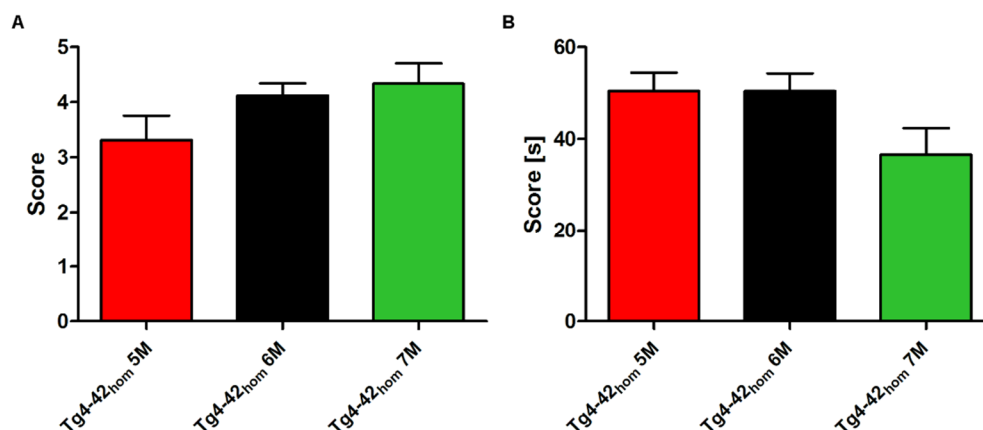


Abbildung 15: Entwicklungen des motorischen Phänotyps im Altersverlauf. Homozygote Mäuse des Typs Tg4-42_{hom} wurden in drei Gruppen aufgeteilt und im Alter von fünf (n = 16), sechs (n = 17) und sieben Monaten (n = 9) motorischen Tests unterzogen. **(A)** Mäuse aller Altersgruppen erzielen hohe Werte im *String Suspension Test* und steigern sich mit zunehmendem Alter. Im statistischen Vergleich liegen keine signifikanten Unterschiede vor (einfaktorielle Varianzanalyse). **(B)** Im *Balance Beam Test* können sich Tg4-42_{hom}-Mäuse aller getesteten Altersstufen lange Zeit auf dem Stab halten. Mäuse der Altersgruppe 7M erreichen hier den niedrigsten Wert, während die der Gruppen des Alters von fünf bzw. sechs Monaten ähnlich hoch ausfielen. Signifikante Unterschiede ließen sich jedoch nicht feststellen (einfaktorielle Varianzanalyse).

3.2.2 *Enriched Environment* führt nicht zu einer signifikanten Verbesserung der motorischen Fähigkeiten

Weibliche Mäuse, die seit dem Alter von zwei Monaten unter EE-Bedingungen des (siehe Kapitel 2.3.2) gehalten wurden, wurden ebenfalls den beiden oben genannten Tests unterzogen und mit der unbehandelten Gruppe desselben Alters aus 3.2.1 verglichen. Wie bereits unter 1.14 beschrieben, wurden hier weibliche Tiere miteinander verglichen. Hierbei erzielten die Tiere im *String Suspension Test* eine hohe Punktzahl (**EE**: $M = 4 \pm 0,3519$), die sich nicht signifikant von den unter Standardbedingungen gehaltenen Tieren des gleichen Alters (**SH**: $M = 4 \pm 0,3015$) unterschied (Abbildung 16 A).

Im *Balance Beam Test* konnte für Tiere aus der *Enrichment*-Gruppe (**EE**: $M = 53,42 \text{ s} \pm 2,4475$) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der unter Standardbedingungen gehaltenen gleichaltrigen Gruppe (**SH**: $M = 47,39 \text{ s} \pm 5,151$) festgestellt werden (Abbildung 16 B).

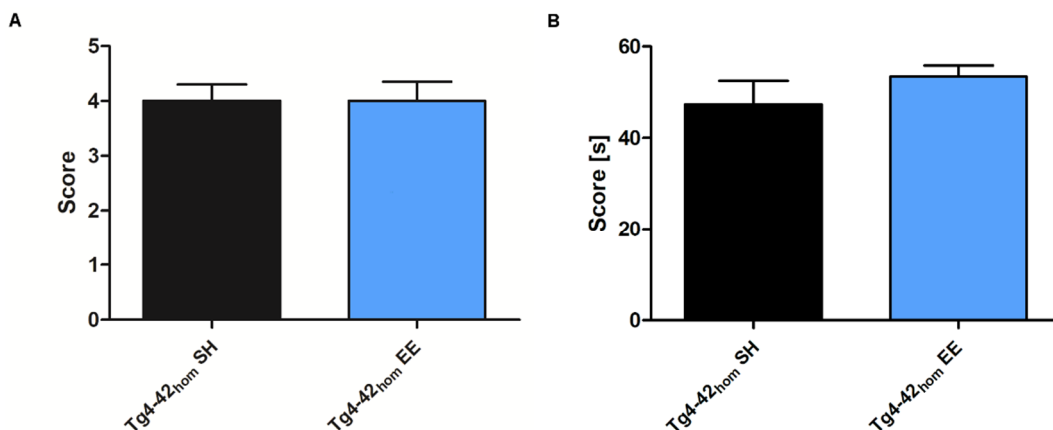


Abbildung 16: Einfluss von EE auf den motorischen Phänotyp. Eine Gruppe von Mäusen Tg4-42_{hom} die für drei Monate im EE gehalten wurde (EE; n = 15), wurde im Alter von sechs Monaten mit unter Standardbedingungen gehaltenen Tieren verglichen (SH; n = 12). **(A)** Mäuse aus dem EE erzielen eine vergleichbar hohe Punktzahl im *String Suspension Test* (EE: M = 4 ± 0,3519; SH: M = 4 ± 0,3015), es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. **(B)** Im *Balance Beam Test* zeigen EE-Mäuse keinen signifikanten Unterschied zur SH-Kontrollgruppe (EE: M = 53,42 s ± 2,4475; SH: M = 47,39 s ± 5,151) (t-Test).

3.3 *Morris Water Maze Test*

3.3.1 Verlust der Fähigkeit des räumlichen Bezugsgedächtnisses im Altersverlauf bei Tg4-42_{hom}-Mäusen

Durch vorangegangene Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es bei Mäusen des Typs Tg4-42_{hom} im fortgeschrittenen Lebensalter zu deutlichen Einschränkungen des räumlichen Lernvermögens kommt (Bouter et al. 2013). Bisher war jedoch nicht klar, zu welchem genauen Zeitpunkt sich dies messbar manifestiert. Zur weiteren Klärung dieser Frage wurden Tg4-42_{hom}-Tiere im Alter von vier, fünf und sechs Monaten im MWM untersucht (n = 9 - 17). Der MWM bestand aus drei Teilversuchen: Dem dreitägigen *Cued Training*, dem fünftägigen *Acquisition Training* sowie dem abschließenden *Probe Trial*.

Das *Cued Training* diente dazu, relevante Einschränkungen der Motorik oder optischen Wahrnehmung in den untersuchten Tieren auszuschließen. Hierzu wurde über eine Spanne von drei Tagen die Zeit gemessen, die die Mäuse benötigten, um eine in einem mit eingefärbtem Wasser gefüllten Becken befindliche, mit einer blauen Fahne markierte, Plattform zu erreichen. Diese Plattform befand sich unter der Wasseroberfläche und war bis auf die Markierung nicht zu sehen. Die Position der Plattform wurde mehrmals nach einem vorher festgelegten Muster verändert. Außerdem wurde während des gesamten Versuchsabschnitts die Schwimmgeschwindigkeit der einzelnen Mäuse aufgezeichnet.

Während des dreitägigen *Cued Trainings* verringerte sich die Zeit, die durchschnittlich zum Auffinden der markierten Plattform benötigt wurde in allen drei Altersstufen stetig (Abbildung 17 A, **5M**: Tag1: $M = 39,17 \text{ s} \pm 3,014$; Tag3: $M = 18,94 \text{ s} \pm 2,609$; **6M**: Tag1: $M = 43,23 \text{ s} \pm 2,644$; Tag3: $M = 22,09 \text{ s} \pm 2,236$ **7M**: Tag1: $M = 47,98 \text{ s} \pm 2,052$; Tag3: $M = 27,14 \text{ s} \pm 3,787$). Somit stand fest, dass alle Mäuse weder motorisch noch in ihrer optischen Wahrnehmung beeinträchtigt und das Testprinzip erlernt hatten.

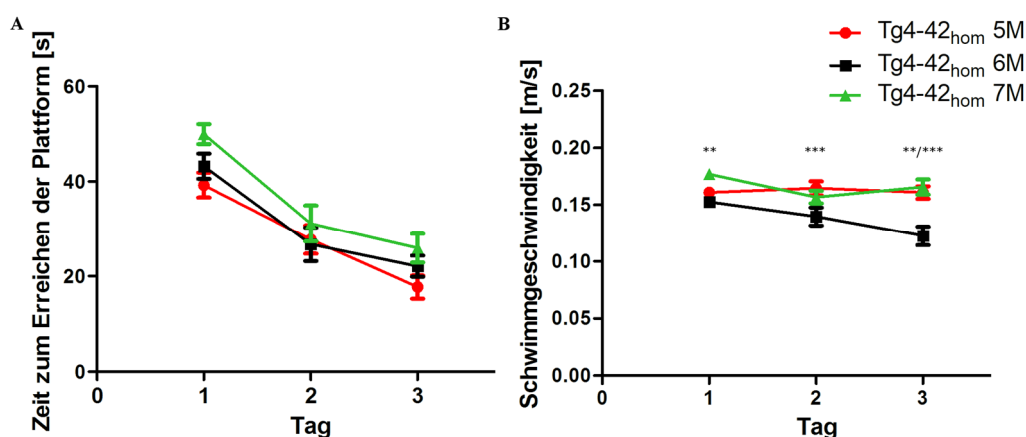


Abbildung 17: Cued Training im Altersverlauf. Während des *Cued Trainings* wurde über einen Zeitraum von drei Tagen die durchschnittlich zum Auffinden der sich unter Wasser befindenden Plattform benötigte Zeit (Fluchtzeit) gemessen. Hierfür wurden Tg4-42_{hom}-Mäuse der o.g. Altersstufen verwendet. **(A)** Über den Verlauf des *Cued Trainings* nimmt die durchschnittliche Fluchtzeit (in Sekunden) in allen Altersgruppen stetig ab. **(B)** Die Schwimmgeschwindigkeit fünf- und siebenmonatiger Tiere ist während des *Cued Trainings* vergleichbar, wobei die der sechs Monate alten Tiere an allen Tagen signifikant niedriger im Vgl. zu den anderen Altersgruppen liegt (an Tag 1 sign. langsamer als 7M, an Tag 2 sign. langsamer als 5M, an Tag 3 sign. langsamer als 5M (***) und 7M (**). Angaben in m/s. (Schwimmgeschwindigkeit und Fluchtzeit: zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit Bonferroni-Korrektur, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ $n = 9 - 17$).

Nach 24 Stunden wurden dieselben Mäuse dem *Acquisition Training* unterzogen. Dazu wurde die Markierung von der Plattform entfernt und zusätzliche Orientierungshilfen am Beckenrand angebracht. Die Position der Plattform blieb während des gesamten *Acquisition Trainings* gleich, lediglich der Ort, an dem die Mäuse ins Wasser gesetzt wurden, wurde nach einem festen Schema verändert. Wie beim *Cued Training* wurde nun über einen Versuchszeitraum von fünf Tagen die durchschnittlich benötigte Zeit zum Auffinden der versteckten Plattform sowie die Schwimmgeschwindigkeit der Mäuse gemessen. Tiere aller untersuchten Altersgruppen zeigten während der fünf Tage eine stetige Verbesserung (Abbildung 18). Es kam in allen untersuchten Gruppen zu einer signifikanten Verringerung der benötigten Zeit vom ersten zum fünften Tag kam. (**5M**: Tag1: $M = 46,08 \text{ s} \pm 2,632$;

Tag5: $M = 21,26 \text{ s} \pm 2,766$; **6M**: Tag1: $M = 40,59 \text{ s} \pm 2,343$; Tag5: $M = 29,96 \text{ s} \pm 3,338$; **7M**: Tag1: $M = 34,28 \text{ s} \pm 4,317$; Tag5: $M = 23,39 \text{ s} \pm 2,646$).

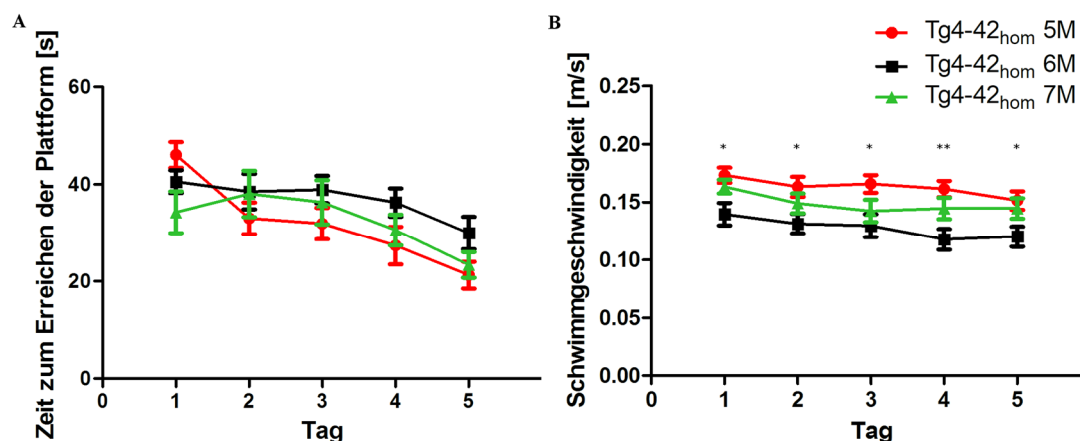


Abbildung 18: Acquisition Training im Altersverlauf. Analog zum *Cued Training* wurde während des fünftägigen *Acquisition Trainings* ebenfalls die Fluchtzeit sowie die Schwimmgeschwindigkeit gemessen. **(A)** Während des Zeitverlauf verbesserten sich die Mäuse der einzelnen Altersgruppen stetig (Angaben in Sekunden). **(B)** Die Schwimmgeschwindigkeit blieb innerhalb der einzelnen Altersgruppen während des gesamten Versuches vergleichbar. Bei der Altersgruppe der sechs Monate alten Tiere liegt diese signifikant niedriger als die der fünf Monate alten Tiere. Angaben in m/s. (Schwimmgeschwindigkeit und Fluchtzeit: zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit Bonferroni-Korrektur, $**p < 0,01$; $*p < 0,05$; $n = 9 - 17$).

Weitere 24 Stunden später erfolgte der abschließende *Probe Trial*. Hierzu wurde die mobile Plattform aus dem Versuchsaufbau entfernt. Die Mäuse wurden für einen einzigen Durchgang vorsichtig ins Wasser gelassen und ihre Position innerhalb des Beckens über einen Zeitraum von 60 Sekunden aufgezeichnet. Diese Position wurde anschließend automatisch dem entsprechenden Quadranten (Goal, Left, Right, Opposite) zugeordnet und die jeweilige Aufenthaltsdauer berechnet. Der Zielquadrant („Goal“) war der Quadrant, in dem sich während des *Acquisition Trainings* die Plattform befunden hatte. Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von fünf Monaten hielten sich durchschnittlich signifikant länger im Zielquadranten im Vergleich zu den anderen Quadranten auf (einfaktorielle Varianzanalyse; **5M**: Goal: $M = 33,19 \% \pm 2,949$; Left: $M = 22,28 \% \pm 2,609$; Right: $M = 23,11 \% \pm 2,413$; Opposite: $M = 21,49 \% \pm 2,670$, Abb. 19A). Es ist also in diesem Alter noch von einem intakten örtlichen Lernen und Gedächtnis auszugehen. Mäuse von sechs und sieben Monaten zeigten keine eindeutige Präferenz für den Zielquadranten mehr. In der statistischen Analyse ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Quadranten feststellen (**6M**: Goal: $M = 29,76 \% \pm 3,536$; Left: $M = 27,32 \% \pm 2,743$; Right: $M = 21,00 \% \pm 3,262$; Opposite: $M = 21,91 \% \pm 2,711$; **7M**: Goal: $M = 31,56 \% \pm 4,435$; Left: $M = 24,02 \% \pm 3,538$; Right: $M = 22,96 \% \pm 2,237$; Opposite: $M = 21,44 \% \pm 2,356$, Abb. 19A). In diesem Zeitraum scheint

sich also eine messbare Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses im MWM bei Tg4-42_{hom} Mäusen zu manifestieren (Abbildung 19A). Während des *Probe Trials* wiesen fünf und sechs Monate alte Mäuse eine ähnliche Schwimmgeschwindigkeit auf, während die sieben Monate alte Gruppe eine signifikant höhere Schwimmgeschwindigkeit aufwies (einfaktorielle Varianzanalyse; **5M**: $M = 0,1643 \text{ m/s} \pm 0,00909$ **6M**: $M = 0,1482 \text{ m/s} \pm 0,01294$ **7M**: $M = 0,1963 \text{ m/s} \pm 0,01149$; Abbildung 19B). Die Schwimmgeschwindigkeit ist in diesem Abschnitt des Versuches jedoch zu vernachlässigen, da sie keinen Einfluss auf die in den einzelnen Quadranten verbrachte relative Zeitspanne hat.

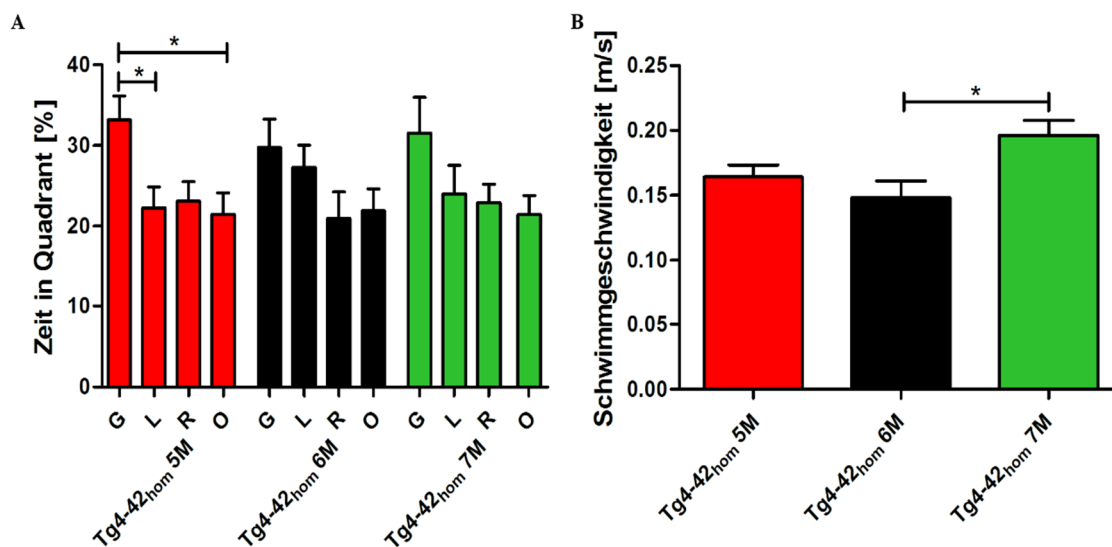


Abbildung 19: Entwicklung der räumlichen Gedächtnisleistung im *Probe Trial*. Während des *Probe Trials* wurde die Position der Tg4-42_{hom}-Mäuse aus den drei Altersgruppen im Wasserbecken bestimmt, dem jeweiligen Quadranten zugeordnet und anschließend ausgewertet. **(A)** Während sich Mäuse im Alter von fünf Monaten noch signifikant länger im Zielquadranten („G“) als zu den Quadranten „L“ und „O“, (im Vgl. zum Quadranten „R“ lässt sich die Präferenz statistisch nicht belegen, deutet sich jedoch in der graphischen Darstellung an) aufhielten, ließ sich diese Präferenz im Altersverlauf nicht mehr nachweisen (einfaktorielle Varianzanalyse, $*p < 0,05$; Beschriftung: Alter in Monaten; Angaben in Prozent an der Gesamtzeit). Je intensiver die Färbung, desto größer die Summe der Aufenthaltsdauer der Mäuse an dieser Position. Der Zielquadrant ist mit „*“ gekennzeichnet. **(B)** Mäuse im Alter von sieben Monaten schwammen signifikant schneller als sechs Monate alte Tiere. Angaben in m/s. Die Schwimmgeschwindigkeit ist für den *Probe Trial* nicht von Bedeutung ($n = 9 - 17$).

3.3.2 *Enriched Environment* rettet Defizite des räumlichen Lernens im *Morris Water Maze Test* bei Tg4-42_{hom}-Mäusen

Im Kapitel 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass sich bei Mäusen des Typs Tg4-42_{hom} im Alter von sechs Monaten objektivierbare Defizite im Bereich des räumlichen Lernens feststellen ließen. Um den Einfluss des EE auf diesen Befund zu untersuchen, wurde eine Gruppe von Mäusen, die vom zweiten bis zum fünften Lebensmonat unter den in Kapitel 2.3.2 genannten Bedingungen gehalten wurde, dem gleichen Versuchsaufbau im MWM unterzogen. Wie bereits vorangehend erläutert, wurden in diesem Abschnitt weibliche Tiere verglichen.

Während des dreitägigen *Cued Trainings* zeigte sich ebenfalls eine deutliche und kontinuierliche Abnahme der zum Erreichen der markierten Plattform benötigten Zeit. Es konnte kein Unterschied zu gleichaltrigen, unter SH-Bedingungen gehaltenen Tg4-42_{hom}-Mäusen festgestellt werden (**EE**: Tag1: M = 44,02 s ± 1,581; Tag3: M = 22,82 s ± 2,729 bzw. **SH**: Tag1: M = 41,97 s ± 3,260; Tag 3: M = 24,67 s ± 2,638). Tiere unter EE-Bedingungen zeigten dabei eine signifikant höhere Schwimmgeschwindigkeit (Abbildung 20).

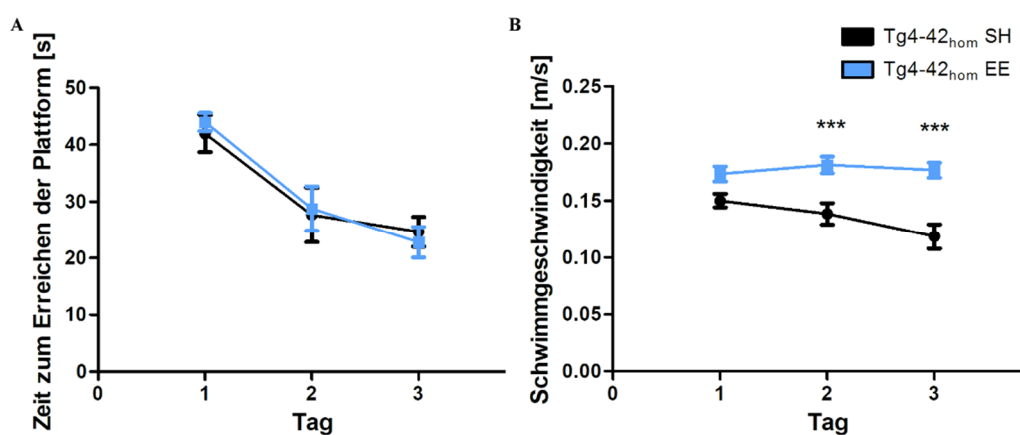


Abbildung 20: Auswirkungen von EE auf das *Cued Training*. Mäuse des Typs Tg4-42_{hom}, die seit dem zweiten Lebensmonat unter Bedingungen des EE gehalten worden waren, wurden im Alter von sechs Monaten getestet und mit gleichaltrigen Mäusen aus der Standardtierhaltung (SH) verglichen. **(A)** Während des dreitägigen *Cued Trainings* nahm die Fluchtzeit konstant ab und verhielt sich ähnlich zu unbehandelten Altersgenossen. **(B)** Tiere aus dem EE schwimmen im Vergleich zu den Tieren aus der Standardhaltung an Tag 2 und 3 signifikant schneller (Schwimmgeschwindigkeit und Fluchtzeit: zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit Bonferroni-Korrektur). Angaben in m/s (***) $p < 0,001$; $n = 12 - 15$).

Im *Acquisition Training* zeigten sich ähnliche Befunde. Auch hier nahm die Zeit, die von EE-Mäusen zum Auffinden der unsichtbaren Plattform benötigt wurde, mit jedem Tag konstant ab. Die Anfangs- und Endwerte sind bei EE und Mäusen aus der Standardtierhaltung (SH) sehr ähnlich, jedoch zeigten die EE-Mäuse eine frühere Verbesserung, während es bei SH-Mäusen erst am letzten Tag des Trainings zu einer deutlichen Verringerung der Zeit kommt (Abbildung 21A, **EE**: Tag1: $M = 39,60 \text{ s} \pm 2,778$; Tag5: $M = 29,48 \text{ s} \pm 3,297$ bzw. **SH**: Tag1: $M = 40,07 \text{ s} \pm 3,034$; Tag5: $M = 28,82 \text{ s} \pm 3,954$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen liegt nicht vor. Die Schwimmgeschwindigkeit von EE-Mäusen lag auch während dieses Versuchsabschnitts durchgehend über der der unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 21B).

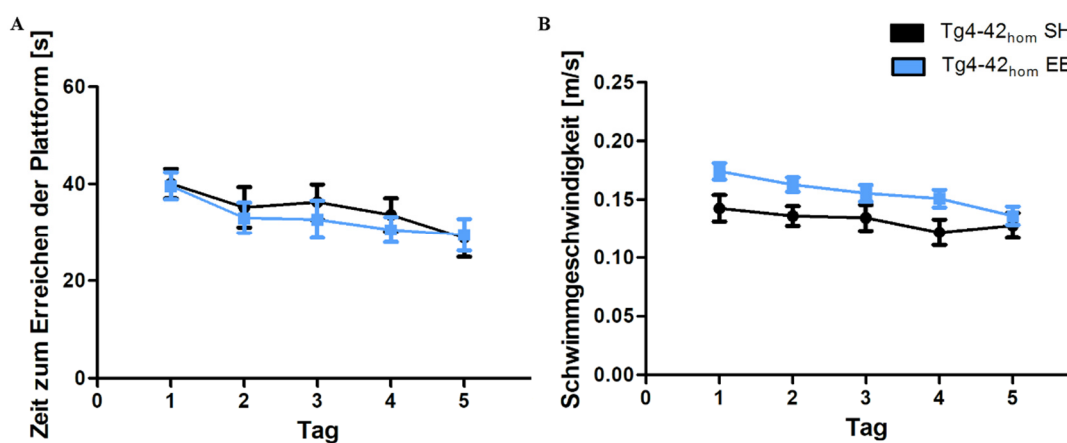


Abbildung 21: Auswirkungen von EE auf das *Acquisition Training*. (A) Sechs Monate alte EE-Mäuse zeigen im *Acquisition Training* ähnlich wie Tg4-42_{hom}-Mäuse aus der Standardtierhaltung (SH) über den Zeitraum des *Acquisition Trainings* eine konstante Verbesserung der Zeit zum Erreichen der Plattform. (B) Auch im *Acquisition Training* zeigen EE-Mäuse an manchen Tagen höhere Schwimmgeschwindigkeiten, allerdings ohne statistisch signifikant zu sein (Schwimmgeschwindigkeit und Fluchtzeit: zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit Bonferroni-Korrektur). Angaben in m/s ($n = 12 - 15$).

Am letzten Versuchstag wurde die Positionen der Tiere aus dem EE im Becken, wie schon bei den unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäusen, während eines einzigen 60 Sekunden dauernden *Probe Trials* aufgezeichnet und den vier Quadranten zugeordnet. Anschließend wurde der Anteil an der gesamten Zeit gemessen, die sich die Mäuse in den jeweiligen Quadranten aufhielten. Hierbei ließ sich ein deutlicher Unterschied der sechs Monate alten EE-Mäuse zu denen aus der Standardtierhaltung (SH) ausmachen. Mäuse aus dem EE hielten sich signifikant länger im Zielquadranten als in den anderen drei Quadranten auf, während die SH-Mäuse desselben Alters keine deutliche Präferenz für einen der Quadranten aufwiesen

(**EE**: Goal: $M = 36,44 \% \pm 3,708$; Left: $M = 17,61 \% \pm 1,634$; Right: $M = 24,11 \% \pm 3,359$; Opposite: $M = 21,87 \% \pm 2,676$; **SH**: Goal: $M = 30,32 \% \pm 3,725$; Left: $M = 24,82 \% \pm 2,716$; Right: $M = 24,56 \% \pm 3,947$; Opposite: $M = 20,29 \% \pm 3,179$; Abbildung 22 A). Diese Präferenz der EE-Mäuse für den Zielquadranten fiel sogar deutlicher als bei unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von fünf Monaten aus. Es lässt sich also postulieren, dass das EE einen positiven Einfluss auf räumliche Gedächtnisfunktionen im MWM hat. Während des *Probe Trials* schwammen Mäuse aus dem EE schneller als SH-Mäuse, jedoch nicht statistisch signifikant (**EE**: $M = 0,1757 \text{ m/s} \pm 0,009128$; **SH**: $M = 0,1538 \text{ m/s} \pm 0,01576$; Abbildung 22 B).

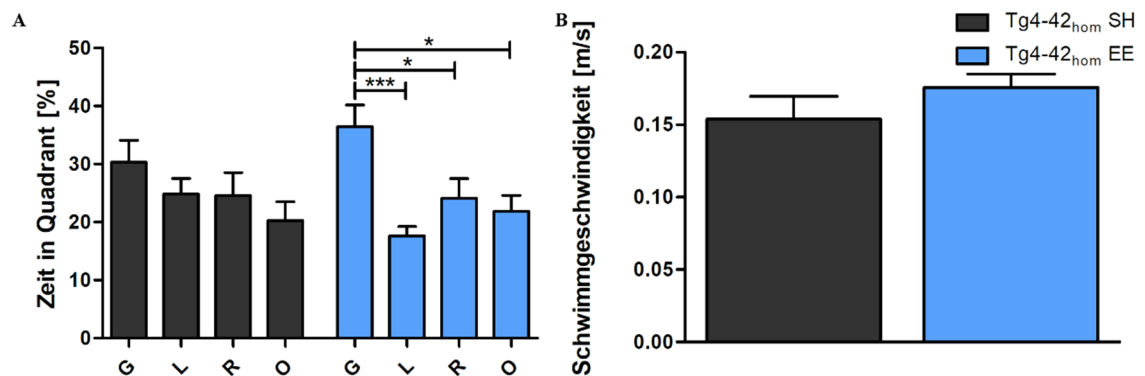


Abbildung 22: Einfluss von EE auf räumliche Gedächtnisleistung im *Probe Trial*. Während des *Probe Trials* wurde die Schwimmposition der Tg4-42_{hom}-Mäuse aus dem EE bestimmt und mit der der gleichaltrigen unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse (SH, siehe Kapitel 3.3.1) verglichen. **(A)** Im Gegensatz zu den SH-Mäusen zeigten EE-Mäuse eine signifikant bis hoch signifikante Präferenz für den Zielquadranten („G“) im Vergleich zu allen anderen Quadranten („L“, „R“, „O“; einfaktorielle Varianzanalyse, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **(B)** EE-Mäuse schwammen während des *Probe Trials* schneller als SH-Mäuse, es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied (t-Test). Angaben in m/s ($n = 12 - 15$).

3.4 *Cross Maze Test*

3.4.1 **Kein Verlust von Funktionen des Arbeitsgedächtnisses von Tg4-42_{hom}-Mäusen im *Cross Maze Test***

Zum Abschätzen der Funktionen des Arbeitsgedächtnisses wurden die Mäuse u. mithilfe des *Cross Maze Tests* untersucht. Die Mäuse wurden am Ende eines Labyrintharms platziert und ihr Bewegungsmuster sowie die Besuche der einzelnen Arme über einen Zeitraum von 10 Minuten aufgezeichnet. Anschließend wurde die Prozentzahl der während des Versuches stattgefundenen Alternationen, also Besuche aller Arme nacheinander ohne Wiederholung, im Vergleich zu den insgesamt möglichen Alternationen bestimmt (Wietrzych et al. 2005; siehe 2.7.4). Die getesteten homozygoten Tg4-42 Mäuse zeigten im Alter von fünf, sechs bzw. sieben Monaten gemessen an den prozentual möglichen Alternationen keine signifikanten Unterschiede zueinander. (**5M**: $M = 32,85 \% \pm 3,351$; **6M**: $M = 35,34 \% \pm 1,949$; **7M**: $M = 34,94 \% \pm 3,083$; einfaktorische Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur). Diese Daten deuten auf ein intaktes Arbeitsgedächtnis hin, wobei hier als Einschränkung ein Vergleich mit nicht-transgenen Wildtyptieren fehlt. Sie liegen jedoch im Bereich vorangegangener Arbeiten von Bouter (2014), wo ein entsprechender Vergleich ohne signifikante Unterschiede zu Wildtyptieren durchgeführt wurde (Abbildung 23 A).

3.4.2 ***Enriched Environment* führt nicht zu einer signifikanten Steigerung des Arbeitsgedächtnisses im *Cross Maze Test***

Neben den unter SH-Bedingungen gehaltenen Tieren wurde ebenfalls eine Gruppe von sechs Monate alten Tieren aus dem EE dem *Cross Maze Test* unterzogen. Hierbei ließ sich kein signifikanter Unterschied zu der entsprechenden SH-Vergleichsgruppe feststellen. Im Vergleich zu den gleichaltrigen Tieren aus der SH wurde insgesamt ein leicht höherer Prozentsatz an Alternationen erreicht (**EE**: $M = 40,62 \% \pm 2,422$), der jedoch statistisch nicht signifikant ausfiel (Abbildung 23 B).

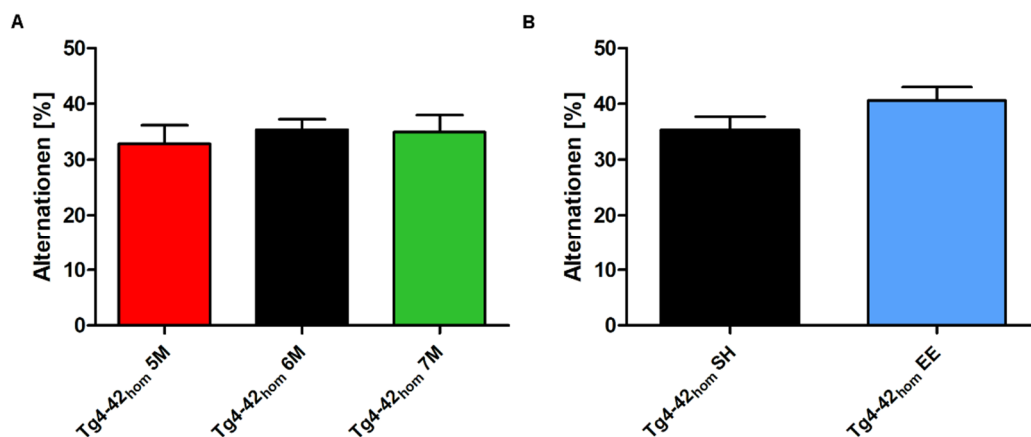


Abbildung 23: Cross Maze Test; Entwicklungen im Altersverlauf und Einfluss von EE. (A) Alle untersuchten Altersgruppen von Mäusen des Typs Tg4-42^{hom} führten eine vergleichbare Menge an Alternationen aus (Angabe als Prozentzahl an möglichen Alternationen). Statistisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen (einfaktorielle Varianzanalyse; Gruppengrößen n = 9 - 18) (B) Im Vergleich zu gleichaltrigen Artgenossen aus der Standardhaltung (SH: M = 35,38 % ± 2,363) führten weibliche EE- Mäuse mehr vollständige Alternationen durch (EE: M = 40,62 % ± 2,422), was jedoch statistisch nicht signifikant war (t-Test, Gruppengrößen n = 13 - 15)

3.5 Stereologie

3.5.1 Tg4-42^{hom} Mäuse zeigen im Altersverlauf einen deutlich zunehmenden hippocampalen Neuronenverlust in der CA1-Region

Wie bereits in vorhergehenden Arbeiten beschrieben, kommt es bei heterozygoten Tg4-42 Tieren zu einer massiven Abnahme der Zahl an hippocampalen Nervenzellen (Bouter et al. 2013). Um diesen Nervenzellverlust auch bei homozygoten Trägern zu bestimmen und in den Altersverlauf einzuordnen, wurden die Neuronen in der Pyramidenzellregion CA1 des Hippocampus mittels der in Kapitel 2.6 beschriebenen stereologischen Verfahren ausgezählt und berechnet (Bregma -1,22 mm bis -3,80 mm). Hierzu wurden 30 µm dicke Gehirnschnitte von Tiergruppen im Alter von fünf, sechs und sieben Monaten mit Kresylviolett gefärbt und untersucht. Bereits bei fünf Monate alten Tieren zeigte sich ein im Vergleich zu bereits aus anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ermittelten Wildtyp-Daten (Antonios et al. 2015; Hüttenrauch et al. 2016b) weit fortgeschrittener Verlust von Neuronen im Abschnitt CA1 (6M: M = 168997,5 ± 6018,09), der über den weiteren Altersverlauf stetig zunahm (7M: M = 151092,2 ± 1665,49; 7M: M = 141224 ± 5944,37). Nach statistischer Analyse aller drei Gruppen zeigte sich zwischen der Gruppe im Alter von fünf Monaten und derjenigen im Alter von sechs Monaten ein signifikanter Unterschied (*p < 0,05), zwischen fünf und sieben

Monate alten Mäusen bestand ein hoch signifikanter Unterschied ($***p < 0,001$; Abbildung 24 A).

3.5.2 *Enriched Environment verzögert hippocampalen Neuronenverlust im Abschnitt CA1*

Um die Auswirkung des EE auf den hippocampalen Nervenzellverlust von homozygoten Tg4-42-Mäusen zu untersuchen, wurden die Gehirne von sechs Monate alten Mäusen, die zuvor unter den unter 2.3.2 beschriebenen Bedingungen gehalten worden waren, aufbereitet und in einer Dicke von 30 μm geschnitten. Diese Hirnschnitte wurden anschließend analog denen der Schnitte aus den Gruppen der Standardhaltungsbedingungen mit Kresylviolett gefärbt und die Neuronen im Abschnitt CA1 des Hippocampus ausgezählt (siehe Kapitel 2.6.2). Es zeigte sich ein deutlich verminderter Untergang der Neuronen in diesem Abschnitt. Im Vergleich zu den unter Standardbedingungen gehaltenen Tieren lag ein statistisch hoch signifikant geringerer Nervenzellverlust vor (**EE**: $M = 172852 \pm 4401,04$) (t-Test, $***p < 0,001$; Abbildung 24 B).

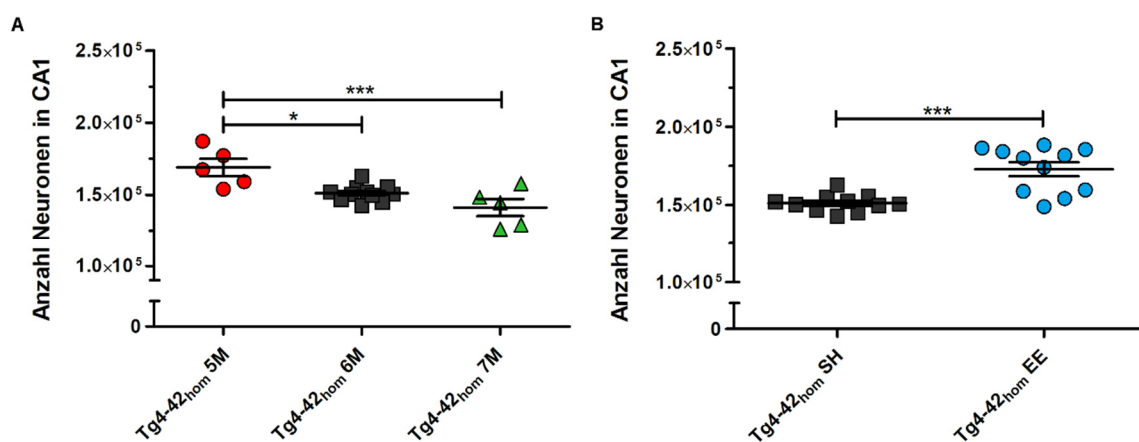


Abbildung 24: Entwicklung der Neuronenzahl in CA1 und Einfluss durch EE. Zum Abschätzen des Neuronenverlusts bei Mäusen des Tg4-42_{hom} wurden die Nervenzellen in der Pyramidenzellschicht CA1 des Hippocampus ausgezählt. **(A)** Bereits im Alter von fünf Monaten kommt es bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Vergleich zu bereits vorliegenden Daten zu Wildtyptieren zu einem deutlichen Verlust von Neuronen (Antonios et al. 2015; Hüttenrauch et al. 2016b). Mäuse im Alter von sechs bzw. sieben Monaten zeigen zusätzlich eine signifikant bzw. hochsignifikante Steigerung des Zellverlustes (einfaktorielle Varianzanalyse, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$). **(B)** Unter dem Einfluss des EE kommt es zu einer deutlichen Verzögerung des Neuronenverlusts. EE-Mäuse zeigen verglichen mit der gleichaltrigen Gruppe aus der Standardtierhaltung (SH) eine hoch signifikant größere Neuronenpopulation in der CA1-Region (t-Test, $***p < 0,001$). Gruppengrößen $n = 5 - 11$.

4 Diskussion

4.1 A β ₄₋₄₂ als Ursache des zunehmenden Untergangs von Neuronen im Hippocampus und konsekutiven Verhaltensdefiziten im Altersverlauf beim transgenen Mausmodell Tg4-42_{hom}

Seit ihrer Erstbeschreibung durch Alois Alzheimer (1907) vor mehr als einhundert Jahren ist die nach ihm benannte Alzheimer-Krankheit eng mit ihren neuropathologischen Charakteristika verknüpft. Neben einem Untergang von Nervenzellen und Neurofibrillenbündeln sind dies extrazelluläre Eiweißablagerungen im Gehirn, die sog. senilen Plaques. Diese Ablagerungen bestehen hauptsächlich aus Peptiden des Typs Amyloid- β (Glennner und Wong 1984), das durch Schneiden von APP mittels bestimmter Enzyme, sog. Sekretasen, entsteht (De Strooper 2010). Lange hat man die Alzheimerforschung sich auf die mit der Aminosäure Aspartat beginnenden vollständigen Amyloidpeptide A β ₄₀ und A β ₄₂ konzentriert, wobei A β ₄₂ der Hauptanteil an der Pathogenese des M. Alzheimer zugesprochen wird. Diese Variante lässt sich früher und in größerer Konzentration in den Plaques nachweisen, weist eine höhere Neigung zur Ausbildung von Fibrillen auf und besitzt auch im löslichen Zustand neurotoxische Eigenschaften (Jarrett et al. 1993; Iwatsubo et al. 1994; Lemere et al. 1996; Shankar et al. 2007).

Bei genauerer Betrachtung weisen die vorhandenen A β -Spezies im Gehirn von Patienten mit AD jedoch eine hohe Heterogenität auf und es existieren zahlreiche Varianten, die am Carboxy- oder am Amino-Terminus trunkiert sind. In den letzten Jahren haben diese zunehmend an wissenschaftlicher Bedeutung gewonnen (Wirhth und Zampar 2019). Massenspektrometrische Analysen von A β -Peptiden aus löslichen und unlöslichen Aggregaten im Gehirn von sechs Patienten mit bestätigtem Morbus Alzheimer und schwerer Demenz konnten z. B. zeigen, dass 30 % der Peptide Verkürzungen am C-Terminus und sogar über 70 % am Amino-Terminus aufweisen (Wildburger et al. 2017). Auch bei Patienten mit einer Alzheimer-Erkrankung im präklinischen Stadium zeigen sich bereits Akkumulationen von N-trunkierten Varianten (Sergeant et al. 2003). Ebenso konnte in verschiedenen transgenen Mausmodellen für den M. Alzheimer eine heterogene Mischung von N-terminal verkürzten A β -Spezies nachgewiesen werden, im Gegensatz zum Menschen ist der Anteil am Gesamt-A β jedoch deutlich geringer (Kawarabayashi et al. 2001; Casas et al. 2004). Deletionen am N-Terminus sind mit veränderten Eigenschaften des A β -Peptids verbunden. Nach Pike et al. (1995b) beschleunigen sie die Ausbildung von löslichen Oligomeren. Ebenso bleiben N-terminal verkürzte A β -Varianten länger löslich und besitzen

eine größere Neurotoxizität (Bayer und Wirths 2014). Zudem korrelieren lösliche A β -Oligomere besser mit kognitiver Dysfunktion als das Ausmaß von Amyloidplaques und es bestehen wachsende Hinweise darauf, dass neben extrazellulären Plaques auch toxische Effekte von intrazellulärem A β eine wichtige Rolle spielen könnten (Tseng et al. 2004; Lesné et al. 2006; Benilova et al. 2012). Zusammengefasst sind in den letzten Jahren die Hinweise dafür, dass A β -Spezies mit Kürzungen am Amino-Terminus eine wichtige Rolle in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit spielen, stetig gewachsen und haben diese weiter in den Fokus der Forschung gerückt (Jawhar et al. 2011; Kummer und Heneka 2014; Wirths und Zampar 2019).

Eine dieser oben beschriebenen N-terminal verkürzten A β -Varianten ist A β_{4-42} . Bereits 1985 ergaben Untersuchungen von Masters et al. (1985), dass der Großteil (nämlich 64 %) der untersuchten A β -Spezies in Amyloidplaques bei Patienten mit sporadischem M. Alzheimer mit einem Phenylalaninrest an Position 4 (A β_{4-42}) beginnt. Auch bei Arbeiten von Lewis et al. (2006) war dies die vorherrschende Isoform von A β -Peptiden. Andere Autoren konnten massenspektrometrisch zeigen, dass A β_{4-42} neben A β_{1-42} die dominante A β -Variante im Kortex und Hippocampus von Patienten, die an einer familiären oder der sporadischen Form des M. Alzheimer erkrankt waren, darstellt (Portelius et al. 2010). Trotz der frühen Entdeckung wurde A β_{4-42} und seine Rolle in der Alzheimerpathogenese bisher in der Forschung nur wenig beachtet. Zur weiteren Erforschung bietet sich hier die Arbeit mit transgenen Tiermodellen an. Einige transgene Mausmodelle, z. B. Mäuse der Linien 5XFAD und APP/PS1KI bilden u. a. A β_{4-42} aus (Casas et al. 2004; Wittnam et al. 2012). Da bei diesen Modellen jedoch auch eine große Menge weiterer N-terminal verkürzter A β -Spezies gebildet werden und sie zudem auch verschiedene Mutationen der familiären Form des M. Alzheimer unterliegen, eignen sie sich nicht zur speziellen Erforschung des Einflusses von A β_{4-42} . Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe das transgene Mausmodell Tg4-42 entwickelt (siehe 2.2.1). Diese Tiere exprimieren unter Kontrolle eines murinen Thy1-Promotors humanes A β_{4-42} . Mutationen für eine familiäre Form der Alzheimer-Krankheit liegen hier nicht vor. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass A β_{4-42} stabile Aggregate bildet und es bei Mäusen zu einem alters- und Gendosisabhängigen Verlust von Neuronen im Hippocampus und deutlichen Einschränkungen in Gedächtnisfunktionen führt. Dies geschieht ohne die Ausbildung relevanter extrazellulärer Plaqueablagerungen oder Neurofibrillenbündel (Bouter et al. 2013; Antonios et al. 2013). Stereologische Untersuchungen sowie Verhaltenstest aus vorherigen Arbeiten ergaben bisher, dass heterozygote und homozygote Tiere im Alter von drei Monaten noch keine Einschränkungen des räumlichen Bezugsgedächtnisses im MWM zeigen. Im Alter von zwölf

Monaten sind bei heterozygoten Tieren ausgeprägte Defizite auffällig. Homozygote Tiere sind von den Auswirkungen schon deutlich früher betroffen. Hier ließen sich bereits im Alter von acht Monaten deutliche Einschränkungen erkennen (Bouter et al. 2013). Der genaue Zeitpunkt, an dem sich diese Defizite objektiv messbar manifestieren, war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht geklärt. Daher wurden im Rahmen dieser Dissertation Versuche unternommen, diesen Zeitpunkt genauer zu bestimmen, indem homozygote Tiere des Typs Tg4-42 im Altersverlauf von fünf, sechs und sieben Monaten untersucht wurden. Zusätzlich sollte mittels stereologischer Untersuchungen ein Bezug zum Neuronenverlust in der Pyramidenzellschicht CA1 des Hippocampus hergestellt werden.

Im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung kann es auch zu motorischen Beeinträchtigungen kommen, die sogar früher als der als charakteristisch angesehene fortschreitende Abbau kognitiver Funktionen beginnen können (Wirths und Bayer 2008; Albers et al. 2015). Einige transgene Mausmodelle des M. Alzheimer (z. B. 5XFAD und APP/PS1KI) weisen ebenso im Altersverlauf deutliche motorische Einschränkungen auf (Wirths et al. 2008; Jawhar et al. 2012; O'Leary et al. 2018). Um die motorischen Fähigkeiten der Tiere zu beurteilen, wurden diese vor den Verhaltenstest zwei motorischen Test unterzogen. Dies ist auch insofern wichtig, als die Folgeversuche, v. a. der MWM, von den motorischen Fertigkeiten der untersuchten Tiere abhängig sind und entsprechende Einschränkungen die Ergebnisse verfälschen können. Mithilfe des *String Suspension Test* wurde die Greifkraft und die Koordination grober Motorik bewertet. Die feineren motorischen Koordinationsfähigkeiten wurde mithilfe des *Balance Beam Tests* geprüft (Luong et al. 2011). Tg4-42_{hom}-Mäuse aller untersuchten Altersgruppen zeigten in beiden Tests keine signifikanten Einschränkungen, wobei die Altersgruppe von sieben Monaten im *Balance Beam Test* eine etwas eingeschränkte Leistung zeigte. Wagner et al. (2019) konnten jedoch eine signifikant schlechtere Leistung von sieben Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen im *Balance Beam Test* herausarbeiten. Wie bereits oben erwähnt, ist auch in dieser Arbeit eine Tendenz zur Verschlechterung zu erkennen, deren Ausmaß hier aber (noch) nicht signifikant ausfällt. In einer aktuellen Arbeit (Stazi und Wirths 2021a) schneiden Tg4-42_{hom}-Tiere desselben Alters neben dem *Balance Beam Test* zudem signifikant schlechter im Rotarod-Test im Vgl. zu WT-Tieren ab. Es deutet sich somit an, dass ab dem sechsten bis siebten Lebensmonat bei Tg4-42_{hom}-Mäusen, die motorischen Defizite ersichtlich werden.

Der MWM wurde bereits in den Achtzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts durch den namensgebenden Forscher Richard G. Morris entwickelt und findet seitdem weit verbreitete Anwendung (Morris 1981). Dieser Test ist vor allem zur Überprüfung der Funktion des Hippocampus geeignet, aber auch Fehlfunktionen in anderen Bereichen des zentralen

Nervensystems können sich auf das Abschneiden im MWM auswirken (Morris 1984; Whishaw et al. 1997; Savage et al. 1997; Decker et al. 1995; D’Hooge und Deyn 2001). Aufgrund seines Aufbaus lässt das MWM eine Abgrenzung des räumlichen Lernens zum räumlichen Bezugsgedächtnis zu (Vorhees und Williams 2006). Viele transgene Mausmodelle der Alzheimer-Krankheit weisen Einschränkungen im MWM auf (Hsiao et al. 1996; Billings et al. 2005; Webster et al. 2013; Edwards et al. 2014; Bouter et al. 2014). Bei Mäusen der Tg4-42-Linie konnten sowohl bei heterozygoten als auch homozygoten Tieren Defizite im MWM gezeigt werden (Bouter et al. 2013). Über die drei Tage des *Cued Trainings* zeigten alle Tg4-42_{hom}-Tiere sich stetig verkürzende Fluchtzeiten zum Erreichen der Plattform. Das *Cued Training* dient vor allem zur Bestätigung, dass die untersuchten Tiere über ausreichende visuelle und motorische Fertigkeiten verfügen, um den MWM absolvieren zu können. Dies deckt sich mit den oben beschriebenen Ergebnissen der motorischen Tests. Im *Acquisition Training*, das zur Bewertung des räumlichen Lernens dient, zeigten die Mäuse aller Altersgruppen stetig und signifikant abnehmende Fluchtzeiten. Signifikante Unterschiede an den einzelnen Tagen im Vergleich der einzelnen Gruppen zeigten sich hier nicht, sodass an den hier vorhandenen Daten keine Verschlechterung des räumlichen Lernens zu erkennen ist. Weiterführende Arbeiten, in denen die Anzahl der Tiere in den einzelnen Gruppen vergrößert wurde und die Altersgruppen zudem um eine weitere Gruppe von Tg4-42_{hom}-Tieren im Alter von vier Monaten ergänzt wurde, ergeben signifikant kürzere Fluchtzeiten der vier Monate alten Tiere im Vergleich zu den anderen Altersgruppen (Antonios et al. 2015). Somit ist von einer Verschlechterung des räumlichen Lernens bereits im Alter von fünf Monaten auszugehen, was anhand der Daten in dieser Arbeit nicht zur Darstellung kommt. Im *Probe Trial* des MWM zeigen die Tiere der Altersgruppe von fünf Monaten noch eine signifikante Präferenz für den Zielquadranten, wobei diese bereits eingeschränkt scheint. Das in diesem Alter (noch) intakte Lernverhalten bestätigt sich auch in einer aktuellen Arbeit, in der u. a. Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von drei, fünf und neun Monaten untersucht wurden (Zampar und Wirths 2021). Die Mäuse in den Altersgruppen von sechs und sieben Monaten zeigen keine signifikante Präferenz für den Zielquadranten mehr. Somit ist bei Mäusen des Typs Tg4-42_{hom} davon auszugehen, dass das räumliche Bezugsgedächtnis im Alter von fünf Monaten bereits leicht und ab sechs Monaten deutlich eingeschränkt ist. Zwischenzeitlich weitere erhobene Daten durch Antonios et al. (2015) stützen diese Annahme. Hier zeigen Tiere im Alter von vier Monaten noch eine signifikante Präferenz für den Zielquadranten gegenüber allen anderen Quadranten. Einige der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind ebenfalls in diese Publikation eingeflossen.

Mithilfe des *Cross Maze Test* wurde das Arbeitsgedächtnis der Mäuse untersucht. Hierbei wird wie unter 2.7.4 beschrieben der Quotient der tatsächlich durchgeführten spontanen Alternationen von den während des Tests theoretisch möglichen Alternationen gebildet. Die spontanen Alternationen sind hierbei Ausdruck des natürlichen Erkundungsverhaltens von Mäusen (Dember und Fowler 1958). Obwohl zahlreiche transgene Mausmodelle des M. Alzheimer ausgeprägte Einschränkungen im *Cross*-, *T*-, *Y-Maze* oder anderen ähnlichen Versuchsaufbauten ausbilden (Lovasic et al. 2005; Oakley et al. 2006; Webster et al. 2014), zeigten die hier untersuchten Tg4-42_{hom}-Tiere im Altersverlauf keine signifikanten Unterschiede untereinander. Dies deckt sich mit Ergebnissen vorangegangener Arbeiten, in denen Tg4-42_{hom} keine signifikanten Unterschiede in den spontanen Alternationen im Vergleich zu Wildtyptieren zeigten (Bouter 2014). Eine mögliche Ursache dieses Sachverhalts könnte sein, dass im *Cross Maze Test* neben dem Hippocampus auch andere Hirnareale von Bedeutung sind (Lalonde 2002). Möglicherweise kann die Funktion des Hippocampus trotz deutlichem Untergang von Neuronen hier noch entsprechend kompensiert werden.

Obwohl der Untergang von Nervenzellen und die damit verbundene kortikale Atrophie histopathologische Charakteristika der Alzheimer-Krankheit sind, weisen längst nicht alle transgenen Mausmodelle für den M. Alzheimer einen Neuronenverlust auf (Wirths und Zampar 2020). Dies ist eine der Einschränkungen der transgenen Tiermodelle. Tiermodelle, die einen signifikanten Nervenzellverlust aufweisen, sind z. B. 5XFAD und APP/PS1KI, die beide einen Untergang von Neuronen in Hirnabschnitten zeigen, die vorwiegend intraneuronales A β und interessanterweise keine oder wenige Plaques aufweisen, was die modifizierte Amyloid-Hypothese stützt (Oakley et al. 2006; Bayer und Wirths 2008). Bouter et al. (2013) konnten zeigen, dass es bei Mäusen der Tg4-42-Linie zu einem ausgeprägten Untergang von Neuronen im CA1-Abschnitt des Hippocampus kommt. Gleiches gilt auch für Mausmodelle, die intraneuronales A β _{pE3-42} exprimieren (Wirths et al. 2009; Alexandru et al. 2011; Meißner et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich dementsprechend gut in dieses Bild ein. Mittels Design-basierter Stereologie wurden hier die Neuronen in der CA1-Region gezählt. Auch hier zeigt sich im Altersverlauf ein steter und deutlicher Rückgang von Nervenzellen. Vergleicht man hier die Anzahl der verbliebenen Nervenzellen mit den von in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten von WT-Tieren im Alter von drei bzw. acht Monaten, so ergibt sich für die Altersgruppe von fünf Monaten ein Rückgang von fast 43 %, für die Altersgruppe von sechs Monaten fast 50 % und für sieben Monate alte Tiere ein Nervenzellverlust von über 52 %. Dies deckt sich auch mit ergänzenden Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die im Rahmen anderer Projekte gesammelt wurden (Stazi und Wirths 2021a; Hornung et al. 2019; Zampar und Wirths 2021). Setzt man nun den stereologisch ermittelten

Verlust an Nervenzellen im Abschnitt CA1 des Hippocampus mit den Ergebnissen des MWM ins Verhältnis, so ergibt sich folgendes Bild: Mit einem Neuronenverlust von ca. 43 % weisen Tiere des Typs Tg4-42_{hom} im Alter von 5 Monaten bereits leichte Einschränkungen im räumlichen Bezugsgedächtnis und wahrscheinlich auch im räumlichen Lernen auf. Ab einem Verlust von ca. 50 % der hippocampalen Neuronen im CA1 sind die Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis bereits signifikant ausgeprägt. Dieser Zusammenhang mit dem Ausmaß an neuronalem Untergang im Hippocampus und Einschränkungen im räumlichen Lernen deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten. Nach Broadbent et al. (2004) zeigen Ratten erst ab einem anteiligen Schaden von 30 bis 50 % vom Gesamtvolumen Hippocampus messbare Einschränkungen des räumlichen Lernens. Laut Moser et al. (1995) sind für ein effizientes räumliches Lernen sogar nur 20 bis 40 % des gesamten Hippocampus notwendig. Der Verlust hippocampaler Neuronen kann also bis zu einem gewissen Punkt kompensiert werden.

Zusammenfassend zeigen die o.g. Ergebnisse noch einmal die Bedeutung des Hippocampus für Funktionen des räumlichen Lernens und des räumlichen Bezugsgedächtnisses. Des Weiteren unterstreichen sie den Stellenwert von A β ₄₋₄₂ im Hinblick auf die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung und machen diese Peptidspezies auch als mögliches Target für therapeutische Interventionen interessant. Ebenso festigen sie die bereits durch Bouter (2014) postulierte Eignung des transgenen Mausmodells Tg4-42_{hom} als Modell für die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit deutlich, da sich hier im Altersverlauf ein robuster Phänotyp ausbildet, der auf genetischer Ebene ohne Mutationen der familiären Form des M. Alzheimer auskommt. Zu guter Letzt stützen die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse die modifizierte Amyloidhypothese, da sich im Modell Tg4-42_{hom} trotz Abwesenheit extrazellulärer Plaques aber intraneuronaler A β -Akkumulation ein ausgeprägter Nervenzellverlust und damit einhergehende Defizite in Gedächtnisfunktionen einstellen.

4.2 *Enriched Environment* bremst den hippocampalen Neuronenverlust beim Mausmodell Tg4-42_{hom} und stellt Defizite des räumlichen Lernens wieder her

Neben genetischen Risikofaktoren für die Alzheimer-Krankheit wird die Wahrscheinlichkeit, am M. Alzheimer zu erkranken, nach heutigem Kenntnisstand der Wissenschaft auch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören zum Beispiel ein moderner Lebensstil, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Übergewicht, Schlafmangel, Stress sowie körperliche Inaktivität (Mayeux und Stern 2012; Silva et al. 2019; Mattson 2015; Livingston et al. 2017). Nach Analysen epidemiologischer Studien könnten ca. ein Drittel der weltweiten Fälle von M. Alzheimer auf diese Faktoren zurückführbar sein (Norton et al. 2014). Da diese Faktoren im Gegensatz zu den genetischen Risikomarkern potenziell beeinflussbar sind, besteht hier großes Potenzial zur Prävention. Diese Arbeit und weitere Projekte in unserer Arbeitsgruppe beschäftigen sich mit den modifizierbaren Risikofaktoren kognitiver und körperlicher Stimulation und den Auswirkungen auf die Entwicklung eines Alzheimer-Phänotyps. Friedland et al. (2001) konnten zeigen, dass Menschen, die aktiv physisch und kognitiv fordernden Aktivitäten nachgingen, ein im Vergleich mit Kontrollgruppen vierfach vermindertes Risiko haben, die Alzheimer-Krankheit zu entwickeln. Hamer und Chida (2009) gehen von einer Risikoreduktion von ca. 45 % aus. Auch zahlreiche andere Metastudien zeigen deutliche Hinweise für begünstigende Effekte von körperlicher Aktivität auf die Entwicklung geistigen Abbaus, sogar bei Menschen, bei denen bereits eine leichte kognitive Beeinträchtigung oder Demenz diagnostiziert worden war (Blondell et al. 2014; Heyn et al. 2004; Phillips et al. 2015). Barnes und Yaffe (2011) postulieren, dass ca. 13 % aller weltweiten Alzheimer-Erkrankungen auf körperliche Inaktivität zurückzuführen sind. Dies entspricht ca. 4,3 Millionen Fällen. Besonders vor dem Hintergrund der aktuell im klinischen Alltag nicht vorhandenen kausalen therapeutischen Konzepte machen diese Ergebnisse körperliche und geistige Aktivität und Stimulation als vergleichsweise einfach modifizierbaren Risikofaktor interessant. Das Hauptproblem der oben beschriebenen Analysen ist, dass es sich meist um retrospektive Studien handelt, die häufig außerdem auf persönlichen Berichten beruhen. Dadurch sind Angaben zum Ausmaß der körperlichen und geistigen Aktivität nur schwer objektivierbar. Abhilfe können hier prospektive Studiendesigns mit Tiermodellen schaffen, da diese besser reproduzierbar und miteinander vergleichbar sind. Bei tierexperimentellen Untersuchungen, die sich mit körperlicher bzw. kognitiver Stimulation beschäftigen, findet das Konzept des EE Anwendung. Hierbei wird der Lebensraum der Versuchstiere mithilfe verschiedener Spielzeuge und Objekte komplexer gestaltet und stellt ein nützliches multimodales Werkzeug

dar, um eine Steigerung von sensorischer Stimulation und physischer Aktivität zu erreichen (Rosenzweig et al. 1978a; Nithianantharajah und Hannan 2006). Versuchsprotokolle, die auf dem Konzept des EE fußen, werden seit Jahrzehnten wissenschaftlich angewendet und haben sich entsprechend etabliert (Kempermann 2019).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von EE auf das Mausmodell Tg4-42_{hom} untersucht. Wie unter 1.14 beschrieben wurden Mäuse ab einem Alter von zwei Monaten dem EE unterzogen. Aus vorherigen Arbeiten unserer Gruppe ist bekannt, dass sich in diesem Alter im Vergleich zu Wildtyptieren noch keine messbaren Einschränkungen in Verhaltenstest bzw. Untergang von Nervenzellen im Hippocampus manifestieren (Bouter et al. 2013). Die Intervention mittels EE wurde bis zu dem Alter fortgesetzt, bei dem es zu messbaren Auffälligkeiten im räumlichen Bezugsgedächtnis gekommen ist. Dieser Zeitpunkt konnte im ersten Abschnitt dieser Arbeit auf das Alter von sechs Monaten festgesetzt werden (vgl. auch 3.3.1 bzw. 4.1). Anschließend wurden die Tiere derselben Batterie von Motor- und Verhaltenstests, sowie stereologischen Analysen unterzogen, wie die unbehandelten Tiere im Alter von fünf, sechs und sieben Monaten.

In den Tests zur Beurteilung der motorischen Funktion, bestehend aus dem *Balance Beam Test* und dem *String Suspension Test*, zeigten Tiere aus dem EE keine signifikanten Verbesserungen zur unter SH-Bedingungen gehaltenen Kontrollgruppe. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als in dieser Arbeit die Tg4-42_{hom}-Tiere aus der Standardhaltung keine bzw. noch keine signifikanten Einschränkungen in der Koordination von grober und feiner Motorik aufweisen. Wie jedoch bereits im vorherigen Kapitel erwähnt wurde, konnte mittlerweile gezeigt werden, dass Tg4-42_{hom}-Mäuse bereits ab dem Alter von sechs bis sieben Monaten im Vergleich zu WT-Mäusen eine signifikante Verschlechterung im *Balance Beam Test* aufweisen (Wagner et al. 2019; Stazi und Wirths 2021a), sodass vor diesem Hintergrund eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten möglich erscheint. Weiterführende Arbeiten unserer Gruppe zeigten bereits bei zwölf Monate alten, heterozygoten Tg4-42-Mäusen deutliche Verbesserungen der motorischen Fähigkeiten durch EE (Hüttenrauch et al. 2016a). Auch neuere Studien unserer Arbeitsgruppe, die an sechs Monate alten homozygoten Tieren durchgeführt wurden, zeigten im Vergleich zu SH signifikante Verbesserungen durch EE im Rotarod-Test und im *Balance Beam Test* (Stazi und Wirths 2021b). Bei Tiermodellen für andere neurologische Erkrankungen wie Schlaganfall oder M. Parkinson hatten EE-Konzepte ebenfalls positive Auswirkungen auf motorische Fähigkeiten (Biernaskie und Corbett 2001; Jadavji et al. 2006; Jeffers und Corbett 2018).

Im *Cross Maze Test* zeigten die Tg4-42_{hom}-Tiere aus dem EE eine höhere Prozentzahl von spontanen Alternationen an den gesamten möglichen Alternationen als Geschwistertiere aus der Standardhaltung. In der statistischen Analyse fiel dieser Unterschied jedoch nicht signifikant aus. Tg4-42_{hom}-Tiere aus der Standardhaltung zeigen jedoch im Altersverlauf und auch im Vergleich zu WT-Mäusen keine Einschränkungen des Arbeitsgedächtnisses im *Cross Maze Test* (siehe 4.1). Aus diesem Grund ist die Auswirkung von EE auf das Arbeitsgedächtnis von Tg4-42_{hom}-Mäusen anhand der hier erhobenen Daten nicht abschließend zu beurteilen. In der Arbeit von Stazi und Wirths (2021b) aus unserer Arbeitsgruppe fiel der hier nur angedeutete Unterschied in den Alternationen deutlicher aus. Sechs Monate alte Tg4-42_{hom}-Tiere aus EE zeigten hier signifikant bessere Ergebnisse als gleichaltrige Tiere aus SH-Bedingungen. Auch in anderen Hippocampus-basierten Test schnitten diese Tiere signifikant besser ab. In Bezug auf Tiermodelle anderer Erkrankungen gibt es in der Literatur einige Beispiele für eine verbesserte Performance im *Y- oder Cross-Maze* nach einer Exposition gegenüber EE, wobei andere Arbeiten keinen Unterschied aufzeigen konnte (Martínez-Cué et al. 2005; Wright und Conrad 2008; Görtz et al. 2008; He et al. 2017; Yuede et al. 2009).

Wie in der oben beschriebenen Untersuchung des Altersverlaufs bei Tg4-42_{hom}-Mäusen wurden auch bei den Tieren aus dem EE das räumliche Lernen und das räumliche Bezugsgedächtnis mithilfe des MWM untersucht. Im vorgeschalteten *Cued Training* zeigten EE-Tiere wie ihre unbehandelten Geschwistertiere stetig abnehmende Fluchtzeiten, womit auch bei diesen Tieren ausreichende visuelle und motorische Fähigkeiten für den MWM nachgewiesen wurden. Im anschließenden *Acquisition Training* zeigten EE-Mäuse ebenfalls eine stetige Verbesserung der Fluchtzeiten. Im Vergleich zu den Geschwistertieren aus der Standardhaltung ergaben sich an den Tagen zwei, drei und vier kürzere Zeiten zum Erreichen der Plattform. Dies könnte auf ein verbessertes räumliches Lernen durch EE hindeuten, ist bei fehlender statistischer Signifikanz aber anhand der verfügbaren Daten nicht belegbar. Auch könnten die kürzeren Fluchtzeiten auf die signifikant höhere Schwimmgeschwindigkeit der Mäuse aus dem EE zurückzuführen sein. Diese ist ebenfalls im *Cued Training* signifikant erhöht und suggeriert eine höhere körperliche Fitness der EE-Tiere im Vergleich zu denen aus der Standardhaltung. Im *Probe Trial* zeigen unbehandelte Tiere der Tg4-42_{hom}-Linie ausgeprägte Einschränkungen im räumlichen Bezugsgedächtnis. Wie unter 4.1 beschrieben scheinen diese im Alter von fünf Monaten zu beginnen und sind mit sechs Monaten bereits voll ausgeprägt. Tiere, die im EE gehalten wurden, zeigen im *Probe Trial* eine signifikante Präferenz des Zielquadranten im Vergleich zu allen anderen Quadranten und sogar ein besseres Ergebnis als die untersuchte Altersgruppe von vier Monaten aus der

Standardhaltung. Somit kann die kognitive und körperliche Stimulation des EE die Ausbildung dieses Phänotyps zum Untersuchungszeitpunkt verhindern. Die Schwimmggeschwindigkeit der Tiere aus dem EE war nicht signifikant erhöht. Hierbei ist jedoch auch zu beachten, dass die Schwimmggeschwindigkeit in diesem Versuchsabschnitt keine Relevanz für das Ergebnis hat. Die erhobenen Befunde sind vereinbar mit anderen Arbeiten, die eine bei transgenen Mausmodellen des M. Alzheimer Verbesserungen im MWM und anderen Tests des räumlichen Gedächtnisses nach körperliche Aktivität zeigten (Jankowsky et al. 2005; Valero et al. 2011; García-Mesa et al. 2011; Intlekofer und Cotman 2013; Tapia-Rojas et al. 2016; Stazi und Wirths 2021b).

Die oben genannten Verbesserungen im räumlichen Bezugsgedächtnis gehen bei den im EE gehaltenen sechs Monate alten Tieren mit einem deutlich reduzierten Nervenzellverlust in der Pyramidenzellschicht CA1 des Hippocampus einher. Die mittels Design-basierter Stereologie ermittelte Neuronenzahl zeigt sich im Vergleich mit gleichaltrigen Tieren aus den Standardhaltungsbedingungen signifikant höher und ungefähr auf dem Niveau von Tieren im Alter von fünf Monaten, was sich auch in einer ähnlichen Performance im *Probe Trial* des MWM widerspiegelt. Verglichen mit der in Antonios et al. (2015) ermittelten Anzahl von Neuronen in CA1 bei Wildtyptieren im Alter von zwei bzw. acht Monaten ergibt sich eine Reduktion von ungefähr 42 % bzw. 38 %. Gegenüber sechs Monate alten WT-Tieren ergeben sich vergleichbare Werte von ca. 41 % (Hüttenrauch et al. 2016b). Es ist somit zu postulieren, dass EE beim Mausmodell Tg4-42_{hom} den neuronalen Verlust im Hippocampus zwar nicht vollständig verhindern, aber signifikant verlangsamen kann. Da in dieser Arbeit lediglich der Effekt von EE auf räumliche Gedächtnisfunktionen und hippocampalen Nervenzellverlust im CA1 untersucht wurde, lässt sich hier keine Aussage über den Effekt von EE auf Tiere des Typs Tg4-42_{hom} im Altersverlauf treffen. Um dies zu beleuchten wäre ggf. eine Untersuchung analog den Versuchen des ersten Abschnitts dieser Arbeit, also die Untersuchung von Tieren mehrere Altersgruppen mit Verhaltenstests und anschließender Stereologie, zu diskutieren.

Das in dieser Arbeit verwendete EE-Protokoll basiert auf einer Mischung aus gesteigerter kognitiver (durch verschiedene regelmäßig veränderte Objekte und Nistmaterial zum Interagieren) und physischer Stimulation (größere Käfige, Laufräder). Somit lässt sich anhand dieses Versuchsdesigns nicht entschlüsseln, ob lediglich eine gesteigerte körperliche Aktivität ausreichend ist, um eine Verminderung des Nervenzellverlusts zu erreichen. In unserer Arbeitsgruppe wurden aus diesem Grund ergänzende Experimente durchgeführt. Hier wurden Tg4-42_{hom}-Mäuse einzeln in Käfigen, die lediglich mit Laufrädern bestückt waren, gehalten. Als Kontrollgruppe dienten Mäuse, in deren Käfigen sich ebenfalls ein

Laufrad befand., das jedoch blockiert war. In der Stereologie wiesen die Mäuse aus den Käfigen mit den beweglichen Laufrädern einen signifikant geringeren Neuronenverlust in der CA1-Region im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Hüttenrauch et al. 2016a). Somit scheint gesteigerte körperliche Aktivität allein ein ausreichender Reiz zu sein, um die auf den neuronalen Untergang protektiven Effekte auszulösen. Dies deckt sich auch mit anderen Arbeiten, die körperliche Aktivität als treibenden Stimulus i.R. des EE identifizierten (van Praag et al. 1999; Mirochnic et al. 2009; Kobilko et al. 2011).

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss des Konzepts des EE auf Arbeitsgedächtnisfunktionen und hippocampalen Nervenzellverlust im APP/PS1KI Alzheimer-Mausmodell untersucht und es konnte kein positiver Effekt des EE nachgewiesen werden (Cotel et al. 2012). Eine mögliche Erklärung dieses Befunds ist, dass es sich bei APP/PS1KI-Tieren um ein transgenes Modell der familiären Form des M. Alzheimer handelt, das gleich mehrere Mutationen trägt und eine sehr aggressive Pathologie zeigt. Hier könnte eine gesteigerte körperliche und geistige Aktivität i.R. des EE eine zu milde Interventionsform sein, um dem Untergang von Neuronen und dem damit verbundenen Phänotyp entgegenzuwirken. Das Modell Tg4-42_{hom} kommt stattdessen vollkommen ohne Mutationen aus und überexprimiert lediglich A β 4-42. Es stellt somit eher ein Modell für die sporadische Form der Alzheimer-Erkrankung dar und könnte somit gegenüber Veränderungen durch Umwelteinflüsse wie dem EE zugänglicher sein.

In dieser Arbeit wurde nicht auf die zellulären oder molekularen Ursachen der oben beschriebenen Verlangsamung des Neuronenverlusts und positiven Einfluss auf Gedächtnisfunktionen bei Tg4-42_{hom} eingegangen. In einigen Arbeiten zeigte sich bei transgenen Tiermodellen des M. Alzheimer verbunden mit Verbesserungen von Gedächtnisdefiziten eine gesteigerte Neurogenese (Mirochnic et al. 2009; Valero et al. 2011). Auch bei Tg4-42_{hom}-Tieren ließ sich eine erhöhte Zahl DCX-positiver Zellen im Gyrus dentatus von EE-Tieren im Vgl. zu SH aufzeigen (Hüttenrauch et al. 2016a). Gerberding et al. (2019) konnten bei Tg4-42_{hom}-Tieren im Alter von sechs Monaten ebenfalls eine signifikante Steigerung der Neurogenese im Gyrus dentatus durch intermittierend oder dauerhaft gesteigerte körperliche Aktivität zeigen. Generell zeigen Tg-42_{hom} Tiere im Alter von sechs Monaten eine signifikant reduzierte Neurogenese (Gerberding et al. 2019; Stazi und Wirths 2021b; Stazi und Wirths 2021a; Zampar und Wirths 2021)2021a; Zampar und Wirths 2021). Des Weiteren beschrieben einige Forschungsarbeiten, bei denen andere transgene Alzheimermodelle unter den Bedingungen von EE oder gesteigerter körperlicher Aktivität untersucht wurden, einen Rückgang der Amyloidplaques (Lazarov et al. 2005; Adlard et al. 2005). Da es beim Modell Tg4-42 nicht zur extrazellulären Ablagerung von A β

kommt, sondern nur lösliche Aggregate gebildet werden, scheint dieser Mechanismus hier nicht ursächlich zu sein. Zudem bestand bei Tg4-42_{het}-Mäusen kein Rückgang der A β -Konzentration von EE-Tieren. Dies deckt sich auch mit anderen Arbeiten, in denen es im Rahmen eines EE bei unveränderter oder sogar gesteigerter Plauepathologie zu einer Verbesserung von Gedächtnisfunktionen kommt (Jankowsky et al. 2005; Wolf et al. 2006; Cotel et al. 2012). Beim Modell Tg4-42 hat eine Transkriptomanalyse des Gehirns eine Induktion von Wachstumsfaktoren wie BDNF und eine Hochregulierung einer Reihe von zytoprotektiven Proteinen (u. a. Hitzeschockproteine) nach EE ergeben, was die positiven Effekte auf die Neuronenzahl und kognitiven Defizite erklären könnte (Hüttenrauch et al. 2016a).

Die Daten dieser Dissertation und der mit ihr in Zusammenhang stehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen einen positiven präventiven Einfluss von EE bzw. körperlicher Aktivität über einen längeren Zeitraum auf den Nervenzellverlust in der Pyramidenzellschicht CA1 im Hippocampus des transgenen Tiermodells Tg4-42_{hom} im Rahmen eines prospektiven Studiendesigns auf. Es unterstützt somit auch die bisher verfügbaren an Menschen epidemiologischen Daten aus retrospektiven Studien. Vor dem Hintergrund, dass sich das Modell Tg4-42 aufgrund des Fehlens typischer Alzheimermutationen gut als Modell der sporadischen Form des Morbus Alzheimer eignet, unterstreicht diese Arbeit den großen Stellenwert von körperlicher Aktivität als relativ einfach modifizierbaren Risikofaktor der Alzheimererkrankung. Dies ist insofern von Bedeutung, als es sich zum aktuellen Zeitpunkt für den Großteil der Patienten (noch) keine kausale medikamentöse Therapie der Alzheimerkrankheit in der klinischen Anwendung befindet.

5 Zusammenfassung

Das am N-Terminus verkürzte $A\beta_{4-42}$ gehört zu den $A\beta$ -Isoformen, die am häufigsten in den Gehirnen von Patienten, die an M. Alzheimer erkrankt sind, vorliegen. Es weist eine gesteigerte Neigung zur Aggregation und erhöhte Toxizität auf, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einem Untergang von Neuronen führt. Das Mausmodell Tg4-42 exprimiert spezifisch $A\beta_{4-42}$ und weist einen Nervenzellverlust auf, der vor allem in der Pyramidenzellschicht CA1 des Hippocampus stattfindet. Es kommt zudem im Altersverlauf zu einem fortschreitenden Verlust von Gedächtnisfunktionen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tg4-42_{hom}-Tiere im Alter von fünf Monaten noch keine eindeutig messbare Einschränkung im räumlichen Bezugsgedächtnis aufweisen, da sie im *Probe Trial* des MWM noch eine gewisse Präferenz für den Zielquadranten zeigen. In einer stereologischen Untersuchung ist in der CA1-Region zu diesem Zeitpunkt jedoch bereits ein Untergang von Neuronen in der Größenordnung von nahezu 43 % zu sehen. Ab dem Alter von sechs Monaten kommt es bei Tg4-42_{hom} zu ausgeprägten Einschränkungen im räumlichen Lernen, was sich in einer fehlenden Präferenz für den Zielquadranten im *Probe Trial* widerspiegelt. Dies geht mit einem Nervenzellverlust im CA1 von fast 50 % bei sechs Monate alten Tieren bzw. über 52 % bei sieben Monate alten Mäusen einher. Ein Nervenzellverlust von ca. 50 % im CA1 scheint somit die Schwelle für ein intaktes räumliches Bezugsgedächtnis zu sein.

Diese Feststellungen unterstreichen den Stellenwert von N-trunkiertem $A\beta_{4-42}$ im Hinblick auf die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung und stützen die modifizierte Amyloidhypothese, da im Mausmodell Tg4-42_{hom} die intraneuronale Akkumulation von $A\beta_{4-42}$ zu einer ausgeprägten hippocampalen Neurodegeneration und damit einhergehenden Einschränkungen von räumlichen Gedächtnisfunktionen führt.

Körperliche Aktivität und kognitive Stimulation konnte in Metastudien als modifizierbare Faktoren mit großem Potenzial im Hinblick auf die Risikoreduktion des M. Alzheimer identifiziert werden. Bei Tiermodellen kann diese Stimulation durch das Konzept des EE simuliert und untersucht werden. Tg4-42_{hom}-Tiere, die ab dem Alter von zwei Monaten im EE gehalten wurden, zeigen im Alter von sechs Monaten im Vergleich zu Tieren aus der Standardhaltung (SH) ein noch funktionierendes räumliches Bezugsgedächtnis, was sich durch eine signifikante Präferenz des Zielquadranten im *Probe Trial* des MWM ausdrückt. Dies geht im Vergleich zu SH-Tieren mit einem hoch signifikant verzögerten hippocampalen Nervenzellverlust im CA1 einher. Dieser beträgt verglichen mit gleichaltrigen Wildtyp-Tieren ca. 41 %. Die zellulären oder molekularen Ursachen sind noch nicht eindeutig geklärt,

scheinen jedoch mit einer gesteigerten hippocampalen Neurogenese sowie der Induktion von Wachstumsfaktoren und zytoprotektiven Proteinen assoziiert zu sein.

Es zeigt sich somit, dass EE bzw. die damit verbundene gesteigerte körperliche Aktivität über einen längeren Zeitraum einen positiven präventiven Einfluss auf den Nervenzellverlust in der Pyramidenzellschicht und damit einhergehende Verluste des räumlichen Bezugsgedächtnis hat. Das in dieser Arbeit verwendete prospektive Studiendesign stützt somit die aus retrospektiven Studien am Menschen gewonnen epidemiologischen Daten. Ebenso wird der Stellenwert von körperlicher Aktivität als einfacher modifizierbarer Risikofaktor der Alzheimererkrankung deutlich.

6 Literaturverzeichnis

Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW (2005): Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25, 4217–4221

Ahmed Z, Cooper J, Murray TK, Garn K, McNaughton E, Clarke H, Parhizkar S, Ward MA, Cavallini A, Jackson S et al. (2014): A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: the pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathol* 127, 667–683

Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR et al. (2008): Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol* 65, 1509–1517

Albers MW, Gilmore GC, Kaye J, Murphy C, Wingfield A, Bennett DA, Boxer AL, Buchman AS, Cruickshanks KJ, Devanand DP et al. (2015): At the interface of sensory and motor dysfunctions and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 11, 70–98

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

Alexander GE, Furey ML, Grady CL, Pietrini P, Brady DR, Mentis MJ, Schapiro MB (1997): Association of premorbid intellectual function with cerebral metabolism in Alzheimer's disease: implications for the cognitive reserve hypothesis. *Am J Psychiatry* 154, 165–172

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

Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 146–148

Alzheimer's Association (2016): 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 12, 459–509

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
- Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, Diamond DM (2001): Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. *Brain Res* 891, 42–53
- Arendt T, Stieler JT, Holzer M (2016): Tau and tauopathies. *Brain Res Bull* 126, 238–292
- Areosa SA, Sherriff F: Memantine for dementia; In: *The Cochrane Database of Systematic Reviews*: John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK 1996
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, van Hoesen GW (1991): The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. *Cerebral Cortex* 1, 103–116
- Bachman DL, Wolf PA, Linn R, Knoefel JE, CobbS J, Belanger A, D'Agostino RB, White LR (1992): Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study. *Neurology* 42, 115
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011): Alzheimer's disease. *Lancet* 377, 1019–1031
- 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
- Barnes DE, Yaffe K (2011): The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *The Lancet Neurology* 10, 819–828
- Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS (1982): The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408–414
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM et al. (2012): Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 367, 795–804
- Bayer TA, Wirths O (2008): Review on the APP/PS1KI mouse model: Intraneuronal A β accumulation triggers axonopathy, neuron loss and working memory impairment. *Genes Brain Behav* 7, 6–11
- 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 (2014): Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 127, 787–801
- Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012): The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15, 349–357
- Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Evans DA, Mendes de Leon CF, Arnold SE, Barnes LL, Bienias JL (2003): Education modifies the relation of AD pathology to level of cognitive function in older persons. *Neurology* 60, 1909–1915
- Beyreuther K, Pollwein P, Multhaup G, Mönning U, König G, Dyrks T, Schubert W, Masters CL (1993): Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 695, 91–102
- Biernaskie J, Corbett D (2001): Enriched Rehabilitative Training Promotes Improved Forelimb Motor Function and Enhanced Dendritic Growth after Focal Ischemic Injury. *J. Neurosci.* 21, 5272–5280
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005): Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688
- Biogen (2020): Biogen Plans Regulatory Filing for Aducanumab in Alzheimer's Disease Based on New Analysis of Larger Dataset from Phase 3 Studies | Biogen, 18 Oktober 2020. <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-plans-regulatory-filing-aducanumab-alzheimers-disease>, abgerufen am: 18.10.2020
- Black RS, Sperling RA, Safirstein B, Motter RN, Pallas A, Nichols A, Grundman M (2010): A single ascending dose study of bapineuzumab in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24, 198–203
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O et al. (2003): Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 184, 247–263
- Blondell SJ, Hammersley-Mather R, Veerman JL (2014): Does physical activity prevent cognitive decline and dementia?: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Public Health* 14, 510
- Borgers H (2017): Therapiemöglichkeiten der Alzheimer-Krankheit durch passive Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper im Tg4-42hom-Mausmodell. Dissertationsschrift Universität Göttingen 2017.
- Bouter Y (2014): The role of amyloid beta 4-42 in the etiology of Alzheimer's disease. Dissertationsschrift Universität Göttingen, 2014.
- Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M et al. (2013): N-truncated amyloid β (A β) 4-42

- forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol* 126, 189–205
- Bouter Y, 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
- Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259
- Braak H, Braak E (1999): Staging of Alzheimer-Related Cortical Destruction. *Int. Psychogeriatr.* 9, 257–261
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY (1993): Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10, 1089–1099
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004): Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14515–14520
- Burke SL, Maramaldi P, Cadet T, Kukull W (2016): Associations between depression, sleep disturbance, and apolipoprotein E in the development of Alzheimer's disease: dementia. *Int Psychogeriatr* 28, 1409–1424
- Butner KA (1991): Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *The Journal of Cell Biology* 115, 717–730
- Casas C, Sergeant N, Itier J-M, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdeux 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
- Cavanaugh SE, Pippin JJ, Barnard ND (2014): Animal models of Alzheimer disease: Historical pitfalls and a path forward. *ALTEX* 31, 279–302
- Cavazzoni P (2021): FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. FDA, 07 Juni 2021. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease>, abgerufen am: 26.6.2021
- Chen HS, Pellegrini JW, Aggarwal SK, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, Lipton SA (1992): Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: Therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 4427–4436
- Chen Y, Dong C (2009): Abeta40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells. *Cell Death Differ* 16, 386–394

- Cheng D, Noble J, Tang MX, Schupf N, Mayeux R, Luchsinger JA (2011): Type 2 diabetes and late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 31, 424–430
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J et al. (2001): Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276, 21562–21570
- Chui DH, Dobo E, Makifuchi T, Akiyama H, Kawakatsu S, Petit A, Checler F, Araki W, Takahashi K, Tabira T (2001): Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Abeta42 labeling. *J Alzheimers Dis* 3, 231–239
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992): Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672–674
- Cohen AD, Klunk WE (2014): Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiol Dis* 72 Pt A, 117–122
- Corder E, Saunders A, Strittmatter W, Schmechel D, Gaskell P, Small G, Roses A, Haines J, Pericak-Vance M (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923
- Cotel M-C, 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
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL (2000): What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* 36, 175–184
- Cras P, Kawai M, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G (1991): Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7552–7556
- Cummings JL (2003): Use of cholinesterase inhibitors in clinical practice: Evidence-based recommendations. *Am J Geriatr Psychiatry* 11, 131–145
- Cummings JL, Back C (1998): The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 6, S64-78
- Cummings JL, Cohen S, van Dyck CH, Brody M, Curtis C, Cho W, Ward M, Friesenhahn M, Rabe C, Brunstein F et al. (2018): ABBY: A phase 2 randomized trial of crenezumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* 90, e1889-e1897
- D'Hooge R, Deyn PPD (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36, 60–90

- Danysz W, Parsons CG (2003): The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatic and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: Preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry* 18, S23-32
- Davies CA, Mann DMA, Sumpter PQ, Yates PO (1987): A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78, 151–164
- De Strooper B (2010): Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: A multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 90, 465–494
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Figura K von, van Leuven F (1998): Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387–390
- De Strooper B, Vassar R, Golde T (2010): The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 99–107
- Decker MW, Curzon P, Brioni JD (1995): Influence of separate and combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety, and locomotor activity in rats. *Neurobiol Learn Mem* 64, 156–168
- Dehmelt L, Halpain S (2005): The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6, 204
- DeKosky ST, Scheff SW (1990): Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27, 457–464
- 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
- Dember WN, Fowler H (1958): Spontaneous alternation behavior. *Psychol Bull* 55, 412–428
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. (2020): Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen
- Ditaranto K, Tekirian TL, Yang AJ (2001): Lysosomal membrane damage in soluble Aβ-mediated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8, 19–31
- 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
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo JL, Blennow K, DeKosky ST, Gauthier S, Selkoe D, Bateman R et al. (2014): Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: The IWG-2 criteria. *Lancet Neurol* 13, 614–629

- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D et al. (1996): Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710–713
- Duyckaerts C, Potier M-C, Delatour B (2008): Alzheimer disease models and human neuropathology: Similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115, 5–38
- Edwards SR, Hamlin AS, Marks N, Coulson EJ, Smith MT (2014): Comparative studies using the Morris water maze to assess spatial memory deficits in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41, 798–806
- Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomquist G, Larsson E, Savitcheva I, Wall A, Ringheim A, Langstrom B, Nordberg A (2006): Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 129, 2856–2866
- Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S (2017): Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 57, 1171–1183
- 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
- Fordyce DE, Farrar RP (1991): Enhancement of spatial learning in F344 rats by physical activity and related learning-associated alterations in hippocampal and cortical cholinergic functioning. *Behavioural Brain Research* 46, 123–133
- Friedland RP, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, Petot GJ, Debanne SM (2001): Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3440–3445
- Frisoni GB, Fox NC, Jack CR, JR, Scheltens P, Thompson PM (2010): The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 67–77
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F (1995): Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527
- García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, LaFerla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C (2011): Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis* 24, 421–454
- Gerberding A-L, 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
- Giannakopoulos P, Hof PR, Kovari E, Vallet PG, Herrmann FR, Bouras C (1996): Distinct patterns of neuronal loss and Alzheimer's disease lesion distribution in elderly individuals older than 90 years. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 1210–1220

- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F et al. (2005): Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64, 1553–1562
- Glenner GG, Wong CW (1984): Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885–890
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989): Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (1988): Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4051–4055
- 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
- Görtz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambrée O, Keyvani K, Paulus W, Sachser N (2008): Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behavioural Brain Research* 191, 43–48
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogeava E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JSK, Younkin S et al. (2013): TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368, 117–127
- Guo Q, Fu W, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP (1999): Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med* 5, 101–106
- Haass C, Schlossmacher M, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon P, Ostaszewski B, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB et al. (1992): Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325
- Haass C, Selkoe DJ (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 101–112
- Hall AM, Roberson ED (2012): Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 88, 3–12

- Hamer M, Chida Y (2009): Physical activity and risk of neurodegenerative disease: A systematic review of prospective evidence. *Psychol Med* 39, 3–11
- Hannan AJ (2014): Review: Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40
- Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383–388
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A et al. (2009): Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1088–1093
- Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN (2003): The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74, 1206–1209
- He C, Tsipis CP, LaManna JC, Xu K (2017): Environmental Enrichment Induces Increased Cerebral Capillary Density and Improved Cognitive Function in Mice. *Adv Exp Med Biol* 977, 175–181
- Hebb DO (1947): The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am Psychol* 1947, 306–307
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003): Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60, 1119–1122
- Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA (2013): Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80, 1778–1783
- Hejl A, Hogh P, Waldemar G (2002): Potentially reversible conditions in 1000 consecutive memory clinic patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 73, 390–394
- Hesse C, Rosengren L, Andreasen N, Davidsson P, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K (2001): Transient increase in total tau but not phospho-tau in human cerebrospinal fluid after acute stroke. *Neurosci Lett* 297, 187–190
- Heyn P, Abreu BC, Ottenbacher KJ (2004): The effects of exercise training on elderly persons with cognitive impairment and dementia: A meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil* 85, 1694–1704
- Honig LS, Tang M-X, Albert S, Costa R, Luchsinger J, Manly J, Stern Y, Mayeux R (2003): Stroke and the Risk of Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 60, 1707–1712
- Hornung K, Zampar S, Engel N, Klafki H, Liepold T, Bayer TA, Wiltfang J, Jahn O, Wirths O (2019): N-Terminal Truncated A β 4-42 Is a Substrate for Neprilysin Degradation in vitro and in vivo. *J Alzheimers Dis* 67, 849–858

- 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
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM et al. (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419–427
- Hüttenrauch M, Brauß A, Kurdakova A, Borgers H, Klinker F, Liebetanz D, Salinas-Riester G, Wiltfang J, Klafki HW, Wirths O (2016a): Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model. *Transl Psychiatry* 6, e800
- Hüttenrauch M, Salinas G, Wirths O (2016b): Effects of Long-Term Environmental Enrichment on Anxiety, Memory, Hippocampal Plasticity and Overall Brain Gene Expression in C57BL6 Mice. *Front Mol Neurosci* 9, 62
- Intlekofer KA, Cotman CW (2013): Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 57, 47–55
- 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
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994): Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 13, 45–53
- Jack CR, Albert MS, Knopman DS, McKhann GM, Sperling RA, Carrillo MC, Thies B, Phelps CH (2011): Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 257–262
- Jack CR, JR, Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Senjem ML, Knopman DS, Shiung MM, Gunter JL, Boeve BF, Kemp BJ et al. (2009): Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1355–1365
- Jack CR, JR, Petersen RC, O'Brien PC, Tangalos EG (1992): MR-based hippocampal volumetry in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 183–188
- Jacob L, Bohlken J, Kostev K (2016): Risk Factors for Mild Cognitive Impairment in German Primary Care Practices. *J Alzheimers Dis*
- Jadavji NM, Kolb B, Metz GA (2006): Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. *Neuroscience* 140, 1127–1138

- Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV (2005): Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25, 5217–5224
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32, 4693–4697
- Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2012): Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 196.e29-40
- Jawhar S, Wirths O, Bayer TA (2011): Pyroglutamate amyloid- β (A β): A hatchet man in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286, 38825–38832
- Jeffers MS, Corbett D (2018): Synergistic Effects of Enriched Environment and Task-Specific Reach Training on Poststroke Recovery of Motor Function. *Stroke* 49, 1496–1503
- Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ (1989): Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 135, 309–319
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ et al. (2013): Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368, 107–116
- Juottonen K, Laakso MP, Insausti R, Lehtovirta M, Pitkanen A, Partanen K, Soininen H (1998): Volumes of the entorhinal and perirhinal cortices in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19, 15–22
- 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
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, Renbing X, Peck A (1988): Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol* 23, 138–144
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saito TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001): Age-Dependent Changes in Brain, CSF, and Plasma Amyloid β Protein in the Tg2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 21, 372–381
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003): Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300, 486–489
- Kempermann G (2019): Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci* 20, 235–245

- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997): More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495
- Khachaturian ZS (2011): Revised criteria for diagnosis of Alzheimer's disease: National Institute on Aging-Alzheimer's Association diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 253–256
- Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994): Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Letters* 351
- Killiany RJ, Moss MB, Albert MS, Sandor T, Tieman J, Jolesz F (1993): Temporal lobe regions on magnetic resonance imaging identify patients with early Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 50, 949–954
- Kivipelto M, Solomon A (2006): Cholesterol as a risk factor for Alzheimer's disease – epidemiological evidence. *Acta Neurologica Scandinavica* 114, 50–57
- Kobilo T, Liu Q-R, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H (2011): Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem* 18, 605–609
- Kummer MP, Heneka MT (2014): Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther* 6, 28
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007): Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27, 796–807
- Lahiri DK, Farlow MR, Greig NH, Sambamurti K (2002): Current drug targets for Alzheimer's disease treatment. *Drug Dev. Res.* 56, 267–281
- Lalonde R (2002): The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26, 91–104
- Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD (1993): Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice corrected. *Nat Genet* 5, 22–30
- Landau SM, Marks SM, Mormino EC, Rabinovici GD, Oh H, O'Neil JP, Wilson RS, Jagust WJ (2012): Association of lifetime cognitive engagement and low beta-amyloid deposition. *Arch Neurol* 69, 623–629
- Lazarov O, Robinson J, Tang Y-P, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM-Y, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005): Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120, 701–713

- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ (1996): Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: Implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis* 3, 16–32
- Lemere CA (2013): Immunotherapy for Alzheimer's disease: Hoops and hurdles. *Mol Neurodegeneration* 8, 1–6
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006): A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–357
- Lesné 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
- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano D, Oshima J, Pettingell W, Yu C, Jondro P, Schmidt S, Wang K et al. (1995): Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269, 973–977
- Lewis H, Beher D, Cookson N, Oakley A, Piggott M, Morris CM, Jaros E, Perry R, Ince P, Kenny RA et al. (2006): Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: Age-related accumulation of amyloid-beta(42) peptide in vascular dementia. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32, 103–118
- Lichtenthaler SF (2011): α -secretase in Alzheimer's disease: Molecular identity, regulation and therapeutic potential. *Journal of Neurochemistry* 116, 10–21
- Liu R-Q, Zhou Q-H, Ji S-R, Zhou Q, Du Feng, Wu Y, Sui S-F (2010): Membrane localization of beta-amyloid 1-42 in lysosomes: A possible mechanism for lysosome labilization. *J Biol Chem* 285, 19986–19996
- Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C et al. (2020): Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 396, 413–446
- Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J et al. (2017): Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet* 390, 2673–2734
- LoBue C, Wadsworth H, Wilmoth K, Clem M, Hart J, JR, Womack KB, Didehbani N, Lacritz LH, Rossetti HC, Cullum CM (2016): Traumatic brain injury history is associated with earlier age of onset of Alzheimer disease. *Clin Neuropsychol*, 1–14
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000): Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: A potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 3, 460–464

- Lovasic L, Bauschke H, Janus C (2005): Working memory impairment in a transgenic amyloid precursor protein TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav* 4, 197–208
- Luchsinger JA, Reitz C, Honig LS, Tang MX, Shea S, Mayeux R (2005): Aggregation of vascular risk factors and risk of incident Alzheimer disease. *Neurology* 65, 545–551
- Lue L-F, Kuo Y-M, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999): Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 155, 853–862
- Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH (2011): Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp*
- Lynch C (2020): World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia, a global survey. *Alzheimers Dement* 16
- Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M (2010): Alzheimer's disease: Clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology* 9, 702–716
- Manos PJ, Wu R (1994): The ten point clock test: a quick screen and grading method for cognitive impairment in medical and surgical patients. *Int J Psychiatry Med* 24, 229–244
- Martínez-Cué C, Rueda N, García E, Davisson MT, Schmidt C, Flórez J (2005): Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behavioural Brain Research* 163, 174–185
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, JR, Morris JC (2001): Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56, 127–129
- Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M, Hansen LA (1990): Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 137, 1293–1297
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245–4249
- Mattson MP (2015): Lifelong brain health is a lifelong challenge: From evolutionary principles to empirical evidence. *Ageing Res Rev* 20, 37–45
- Mayeux R, Stern Y (2012): Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, 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

-
- McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N (2006): Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003154
- Meißner JN, Bouter Y, Bayer TA (2015): Neuron Loss and Behavioral Deficits in the TBA42 Mouse Model Expressing N-Truncated Pyroglutamate Amyloid- β 3-42. *J Alzheimers Dis* 45, 471–482
- Milan V, Fetzer S (2019): Die zukünftige Entwicklung von Demenzerkrankungen in Deutschland – ein Vergleich unterschiedlicher Prognosemodelle. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 62, 993–1003
- Mirochnic S, Wolf S, Staufenbiel M, Kempermann G (2009): Age effects on the regulation of adult hippocampal neurogenesis by physical activity and environmental enrichment in the APP23 mouse model of Alzheimer disease. *Hippocampus* 19, 1008–1018
- Mohamed A, Posse de Chaves E (2011): A β internalization by neurons and glia. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 127984
- Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC (1995): Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5341–5345
- Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cazzato G, Bava A (2002): Ten-Point Clock Test: a correlation analysis with other neuropsychological tests in dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 17, 347–353
- Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA (2002): Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 9, 88–102
- Morris JC (2005): Early-stage and preclinical Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 19, 163–165
- Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47–60
- Morris RGM (1981): Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12, 239–260
- Morrison JH, Hof PR (1997): Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278, 412–419
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995): Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9697–9701
- Moya KL, Benowitz LI, Schneider GE, Allinquant B (1994): The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev Biol* 161, 597–603
- Mucke L, Masliah E, Yu G-Q, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000): High-Level Neuronal

- Expression of A β 1–42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation. *J. Neurosci.* 20, 4050–4058
- Müller P, Fendt M, Müller NG (2019): Pharmakologische Therapie der Alzheimer-Demenz. *Internist* 60, 761–768
- Müllers P, Taubert M, Müller NG (2019): Physical Exercise as Personalized Medicine for Dementia Prevention? *Front Physiol* 10, 672
- Murray MM, Bernstein SL, Nyugen V, Condrón MM, Teplow DB, Bowers MT (2009): Amyloid beta protein: Abeta40 inhibits Abeta42 oligomerization. *J Am Chem Soc* 131, 6316–6317
- Nhan HS, Chiang K, Koo EH (2015): The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: Friends and foes. *Acta Neuropathol* 129, 1–19
- Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006): Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7, 697–709
- Norfray JF, Provenzale JM (2004): Alzheimer's disease: neuropathologic findings and recent advances in imaging. *AJR Am J Roentgenol* 182, 3–13
- Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C (2014): Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *Lancet Neurol* 13, 788–794
- 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
- Olazarán J, Hoyos-Alonso MC, del Ser T, Garrido Barral A, Conde-Sala JL, Bermejo-Pareja F, López-Pousa S, Pérez-Martínez D, Villarejo-Galende A, Cacho J et al. (2016): Practical application of brief cognitive tests. *Neurología (English Edition)* 31, 183–194
- O'Leary TP, Robertson A, Chipman PH, Rafuse VF, Brown RE (2018): Motor function deficits in the 12 month-old female 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 337, 256–263
- Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM (1999): Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology* 53, 1937–1942

- Pacteau C, Einon D, Sinden J (1989): Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: Long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behavioural Brain Research* 34, 79–96
- Pagani M, Giuliani A, Öberg J, Chincarini A, Morbelli S, Brugnolo A, Arnaldi D, Picco A, Bauckneht M, Buschiazzo A et al. (2016): Predicting the transition from normal aging to Alzheimer's disease: A statistical mechanistic evaluation of FDG-PET data. *NeuroImage* 141, 282–290
- Paillard-Borg S, Fratiglioni L, Xu W, Winblad B, Wang H-X (2012): An active lifestyle postpones dementia onset by more than one year in very old adults. *J Alzheimers Dis* 31, 835–842
- Paxinos G, Franklin KBJ: Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates, Fourth edition; Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg 2013
- Pernecky R, Drzezga A, Diehl-Schmid J, Schmid G, Wohlschläger A, Kars S, Grimmer T, Wagenpfeil S, Monsch A, Kurz A (2006): Schooling mediates brain reserve in Alzheimer's disease: findings of fluoro-deoxy-glucose-positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 1060–1063
- Petersen RC (2004): Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 256, 183–194
- Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999): Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56, 303–308
- Phillips C, Baktir MA, Das D, Lin B, Salehi A (2015): The Link Between Physical Activity and Cognitive Dysfunction in Alzheimer Disease. *Phys Ther* 95, 1046–1060
- 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
- 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
- Portelius E, Zetterberg H, Andreasson U, Brinkmalm G, Andreassen N, Wallin A, Westman-Brinkmalm A, Blennow K (2006): An Alzheimer's disease-specific beta-amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 409, 215–219

- Portelius E, Zetterberg H, Dean RA, Marcil A, Bourgeois P, Nutu M, Andreasson U, Siemers E, Mawuenyega KG, Sigurdson WC et al. (2012): Amyloid- β (1-15/16) as a marker for γ -secretase inhibition in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 31, 335–341
- Prencipe M, Casini AR, Ferretti C, Lattanzio MT, Fiorelli M, Culasso F (1996): Prevalence of dementia in an elderly rural population: Effects of age, sex, and education. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 60, 628–633
- Price JL, Morris JC (1999): Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45, 358–368
- Prince M, Cullen M, Mann A (1994): Risk factors for Alzheimer's disease and dementia: a case-control study based on the MRC elderly hypertension trial. *Neurology* 44, 97–104
- Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y (2000): Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12880–12884
- Rasmussen KL, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R (2015): Plasma levels of apolipoprotein E and risk of dementia in the general population. *Ann Neurol* 77, 301–311
- Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, Mathis CA, Blennow K, Barakos J, Okello AA et al. (2010): 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: A phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol* 9, 363–372
- Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ (1991): Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol* 30, 381–390
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H et al. (2007): The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39, 168–177
- Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H (1978a): Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* 153, 563–576
- Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H (1978b): Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* 153, 563–576
- Rovio S, K areholt I, Helkala E-L, Viitaniemi M, Winblad B, Tuomilehto J, Soininen H, Nissinen A, Kivipelto M (2005): Leisure-time physical activity at midlife and the risk of dementia and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 4, 705–711

-
- 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
- Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, Barker SJ, Foley AC, Thorpe JR, Serpell LC et al. (2014): Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82, 1271–1288
- Savage LM, Sweet AJ, Castillo R, Langlais PJ (1997): The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rat. *Behavioural Brain Research* 82, 133–147
- Scarmeas N, Levy G, Tang MX, Manly J, Stern Y (2001): Influence of leisure activity on the incidence of Alzheimer's disease. *Neurology* 57, 2236–2242
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Brickman AM, Cosentino S, Schupf N, Xin-Tang M, Gu Y, Stern Y (2011): Physical activity and Alzheimer disease course. *Am J Geriatr Psychiatry* 19, 471–481
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006): Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 27, 1372–1384
- Schellenberg G, Bird T, Wijsman E, Orr H, Anderson L, Nemens E, White J, Bonycastle L, Weber J, Alonso M et al. (1992): Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258, 668–671
- Scheltens P, Fox N, Barkhof F, Carli C de (2002): Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion. *Lancet Neurol* 1, 13–21
- Schliebs R, Arendt T (2006): The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 113, 1625–1644
- Schmidt ML, Robinson KA, Lee VM, Trojanowski JQ (1995): Chemical and immunological heterogeneity of fibrillar amyloid in plaques of Alzheimer's disease and Down's syndrome brains revealed by confocal microscopy. *Am J Pathol* 147, 503–515
- Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813–831
- Schofield PW, Logroscino G, Andrews HF, Albert S, Stern Y (1997): An association between head circumference and Alzheimer's disease in a population-based study of aging and dementia. *Neurology* 49, 30–37
- Selkoe D, Kopan R (2003): Notch and Presenilin: Regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 565–597

- Selkoe DJ, Hardy J (2016): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**, 595–608
- Seppala TT, Nerg O, Koivisto AM, Rummukainen J, Puli L, Zetterberg H, Pyykko OT, Helisalmi S, Alafuzoff I, Hiltunen M et al. (2012): CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology* **78**, 1568–1575
- Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Watez A, David J-P, Vanmechelen E, Sergheraert C et al. (2003): Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal of Neurochemistry* **85**, 1581–1591
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011): Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**
- Serrano-Pozo A, Qian J, Monsell SE, Betensky RA, Hyman BT (2015): APOEepsilon2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer disease. *Ann Neurol* **77**, 917–929
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C (1992): Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* **359**, 325–327
- Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y et al. (2016): The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **537**, 50–56
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007): Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* **27**, 2866–2875
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA et al. (2008): Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* **14**, 837–842
- Silva MVF, Loures CdMG, Alves LCV, Souza LC de, Borges KBG, Carvalho MdG (2019): Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci* **26**, 33
- 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

Stazi M, Wirths O (2021a): Chronic Memantine Treatment Ameliorates Behavioral Deficits, Neuron Loss, and Impaired Neurogenesis in a Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 58, 204–216

Stazi M, Wirths O (2021b): Physical activity and cognitive stimulation ameliorate learning and motor deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 397, 112951

Stern Y (2009): Cognitive reserve. *Neuropsychologia* 47, 2015–2028

Stern Y (2012): Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 11, 1006–1012

Stern Y, Alexander GE, Prohovnik I, Mayeux R (1992): Inverse relationship between education and parietotemporal perfusion deficit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 32, 371–375

Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R (1994): Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA* 271, 1004–1010

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki 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

Su JH, Cummings BJ, Cotman CW (1993): Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Brain Res* 625, 228–237

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

Swan GE, Carmelli D (2002): Evidence for Genetic Mediation of Executive Control: A Study of Aging Male Twins. *The Journals of Gerontology Series B: Psychological Sciences and Social Sciences* 57, P133-P143

Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK (2002): Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol* 161, 1869–1879

Takeda K, Araki W, Akiyama H, Tabira T (2004): Amino-truncated amyloid beta-peptide (Abeta5-40/42) produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein is deposited in Alzheimer's disease brain. *FASEB J* 18, 1755–1757

Tanzi RE, Bertram L (2005): Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120, 545–555

- Tapia-Rojas C, Aranguiz F, Varela-Nallar L, Inestrosa NC (2016): Voluntary Running Attenuates Memory Loss, Decreases Neuropathological Changes and Induces Neurogenesis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Brain Pathol* 26, 62–74
- Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka S-K, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirttila T (2009): Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 66, 382–389
- Tariot PN, Farlow MR, Grossberg GT, Graham SM, McDonald S, Gergel I (2004): Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: A randomized controlled trial. *JAMA* 291, 317–324
- Teri L, Gibbons LE, McCurry SM, Logsdon RG, Buchner DM, Barlow WE, Kukull WA, LaCroix AZ, McCormick W, Larson EB (2003): Exercise plus behavioral management in patients with Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 2015–2022
- 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, Rub U, Orantes M, Braak H (2002): Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800
- Thambisetty M, Simmons A, Velayudhan L, Hye A, Campbell J, Zhang Y, Wahlund L-O, Westman E, Kinsey A, Guntert A et al. (2010): Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 67, 739–748
- Tseng BP, Kitazawa M, LaFerla FM (2004): Amyloid beta-peptide: The inside story. *Curr Alzheimer Res* 1, 231–239
- Ultsch M, Li B, Maurer T, Mathieu M, Adolfsson O, Muhs A, Pfeifer A, Pihlgren M, Bainbridge TW, Reichelt M et al. (2016): Structure of Crenezumab Complex with A β Shows Loss of β -Hairpin. *Sci Rep* 6, 39374
- Valero J, España J, Parra-Damas A, Martín E, Rodríguez-Álvarez J, Saura CA (2011): Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APP(Sw,Ind) transgenic mice. *PLoS One* 6, e16832
- van Dyck CH (2018): Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol Psychiatry* 83, 311–319
- van Marum RJ (2008): Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 22, 265–274
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999): Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266–270

- 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
- Viola KL, Klein WL (2015): Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 129, 183–206
- Vorhees CV, Williams MT (2006): Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1, 848–858
- Wada H, Nakajoh K, Satoh-Nakagawa T, Suzuki T, Ohru T, Arai H, Sasaki H (2001): Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 47, 271–276
- Wagner JM, Sichler ME, Schleicher EM, Franke TN, Irwin C, Löw MJ, Beindorff N, Bouter C, Bayer TA, Bouter Y (2019): Analysis of Motor Function in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Behav Neurosci* 13, 107
- Wainwright PE, Lévesque S, Krempulec L, Bulman-Fleming B, Mccutcheon D (1993): Effects of environmental enrichment on cortical depth and morris-maze performance in B6D2F2 mice exposed prenatally to ethanol. *Neurotoxicology and Teratology* 15, 11–20
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007): A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry* 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 β 4-x species and marks oligodendrocytes as a source of amyloidogenic peptides in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 137, 239–257
- Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F (1992): Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758–10762
- Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, van Eldik LJ (2014): Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet* 5, 88
- Webster SJ, Bachstetter AD, van Eldik LJ (2013): Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5, 28
- Weintraub D, Rosenberg PB, Drye LT, Martin BK, Frangakis C, Mintzer JE, Porsteinsson AP, Schneider LS, Rabins PV, Munro CA et al. (2010): Sertraline for the treatment of depression in Alzheimer disease: Week-24 outcomes. *Am J Geriatr Psychiatry* 18, 332–340
- 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, 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
- Whishaw IQ, McKenna JE, Maaswinkel H (1997): Hippocampal lesions and path integration. *Current Opinion in Neurobiology* 7, 228–234
- Whitson JS, Selkoe DJ, Cotman CW (1989): Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* 243, 1488–1490
- Wietrzych M, Meziane H, Sutter A, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P, Krezel W (2005): Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 12, 318–326
- Wilcock DM, Colton CA (2008): Anti-amyloid-beta immunotherapy in Alzheimer's disease: Relevance of transgenic mouse studies to clinical trials. *J Alzheimers Dis* 15, 555–569
- 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
- Wilson RS, Segawa E, Boyle PA, Anagnos SE, Hibel LP, Bennett DA (2012): The natural history of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychol Aging* 27, 1008–1017
- Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Smirnov A, Otto M, Paul S, Schmidt B, Klafki H-W, Maler M, Dyrks T et al. (2002): Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry* 81, 481–496
- Wirhns O, Bayer TA (2008): Motor impairment in Alzheimer's disease and transgenic Alzheimer's disease mouse models. *Genes Brain Behav* 7 Suppl 1, 1–5
- Wirhns O, Bayer TA (2010): Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010
- Wirhns O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth H-U, Bayer TA (2009): Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118, 487–496
- Wirhns O, Breyhan H, Schäfer S, Roth C, Bayer TA (2008): Deficits in working memory and motor performance in the APP/PS1ki mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29, 891–901
- Wirhns O, Multhaup G, Bayer TA (2004): A modified β -amyloid hypothesis: Intraneuronal accumulation of the β -amyloid peptide – the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry* 91, 513–520

- Wirhth 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 A β 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
- Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988): Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4884–4888
- Wittnam JL, Portelius E, Zetterberg H, Gustavsson MK, Schilling S, Koch B, Demuth H-U, Blennow K, Wirhth O, Bayer TA (2012): Pyroglutamate amyloid β (A β) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 8154–8162
- Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G (2006): Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 60, 1314–1323
- Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, Tan RP, Clark IA, Abdipranoto A, Vissel B (2013): Neuroinflammation and neuronal loss precede Abeta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8, e59586
- Wright RL, Conrad CD (2008): Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits. *Behavioural Brain Research* 187, 41–47
- Yamaguchi H, Nakazato Y, Hirai S, Shoji M, Harigaya Y (1989): Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain 135, 593–597
- Yarchoan M, Xie SX, Kling MA, Toledo JB, Wolk DA, Lee EB, van Deerlin V, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Arnold SE (2012): Cerebrovascular atherosclerosis correlates with Alzheimer pathology in neurodegenerative dementias. *Brain* 135, 3749–3756
- Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG (2009): Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 35, 426–432
- Zampar S, Wirhth O (2021): Characterization of a Mouse Model of Alzheimer's Disease Expressing A β 4-42 and Human Mutant Tau. *Int J Mol Sci* 22

Zec RF, Burkett NR, Martin TA, Bush SS (2008): Non-pharmacological and pharmacological treatment of the cognitive and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *NRE* 23, 425–438

Zhang MY, Katzman R, Salmon D, Jin H, Cai GJ, Wang ZY, Qu GY, Grant I, Yu E, Levy P (1990): The prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Shanghai, China: impact of age, gender, and education. *Ann Neurol* 27, 428–437

Zhang S, Khanna S, Tang FR (2009): Patterns of hippocampal neuronal loss and axon reorganization of the dentate gyrus in the mouse pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Res* 87, 1135–1149

Zheng H, Koo EH (2011): Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6, 27

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Wirths und Prof. Dr. Thomas Bayer für das interessante Thema sowie die hilfreichen Ratschläge, Anregungen und Denkanstöße, große Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt Geduld bedanken.

PD Dr. Yvonne Bouter für die Einarbeitung im Labor, die sie mit großem Engagement und Herzblut versah. Für die gute Zusammenarbeit und Kollegialität danke ich allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.

Ich danke außerdem Dr. med. Henning Borgers, der mir mit Rat und Tat, ausgesprochenem Engagement und Humor zur Seite stand.