

Aus der Abteilung Neuropathologie
(Prof. Dr. med. W. Brück)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss einer intrazerebralen Infektion mit *Escherichia coli* auf den Verlauf der
Alzheimer-Demenz im Mausmodell**

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

vorgelegt von
Anika Döpke
aus
Lübbecke

Göttingen 2013

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

I. Berichtstatter: Prof. Dr. med. R. Nau

II. Berichtstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Bayer

III. Berichtstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Prolog.....	1
1.2 Alzheimer-Demenz.....	2
1.2.1 Allgemeines	2
1.2.2 Historische Entwicklung.....	4
1.2.3 Amyloid- β -Kaskade.....	4
1.2.4 Inflammatorische Komponente.....	5
1.3 Bakterielle Meningitis	7
1.3.1 Epidemiologie und Symptomatik	7
1.3.2 Pathophysiologie und Therapie.....	8
1.3.3 <i>Escherichia-coli</i> -Meningitis	10
1.4 Einfluss einer Infektion auf die Neurodegeneration.....	11
1.5 Ziele der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Geräte und Chemikalien	15
2.1.1 Geräte.....	15
2.1.2 Reagenzien, Chemikalien	15
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.4 Software	17
2.2 Versuchstiere	17
2.3 Genotypisierung der Tg2576-Mäuse	18
2.3.1 DNA-Extraktion.....	19
2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	20
2.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	21
2.4 Versuchsablauf	23
2.5 Neuropsychologische und motorische Versuche.....	24
2.5.1 Morris Water Maze	24
2.5.2 Rotarod-Test	26
2.5.3 Seil-Test	26
2.6 Intrazerebrale Infektion mit dem Bakterium <i>Escherichia coli</i>	27
2.6.1 Herstellung des Inokulums	27
2.6.2 Die Injektion	27
2.6.3 Verdünnungsreihen und Ausplattieren auf Agarplatten	29
2.6.4 Beurteilung der Infektionsstärke.....	30
2.6.5 Die Antibiose	30

2.7 Gewebepräparation und Proteinextraktion	30
2.7.1 Gehirn-Präparation.....	31
2.7.2 Milz-Präparation	31
2.7.3 Gewebeeinbettung in Paraffin.....	32
2.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	32
2.7.5 Thioflavin-S-Färbung	33
2.7.6 Amyloid- β 1-40- und - β 1-42-ELISA	34
2.8 Statistische Auswertung.....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Differenzen prae infectione zwischen den Tg ^{+/-} - und Tg ^{-/-} -Mäusen.....	38
3.1.1 Phänotypische Merkmale der transgenen und nicht-transgenen Mäuse ..	39
3.1.2 Motorische Tests	40
3.1.3 Neuropsychologische Tests	42
3.2 Differenzen post infectionem zwischen den Tg ^{+/-} - und Tg ^{-/-} -Mäusen.....	44
3.2.1 Gewichtsverlauf	44
3.2.2 Sterblichkeit	46
3.2.3 Intrazerebrale und systemische Bakterienkonzentration	47
3.3 Langfristiger Einfluss der Infektion auf den Gewichtsverlauf	49
3.4 Langfristiger Einfluss der Infektion auf die motorischen Tests	51
3.4.1 Seil-Test	51
3.4.2 Rotarod-Test	52
3.5 Langfristiger Einfluss der Infektion auf die neuropsychologischen Tests	54
3.5.1 Einfluss der Infektion auf die Leistungen der Tg ^{+/-} -Mäuse	54
3.5.2 Einfluss der Infektion auf die Leistungen der Tg ^{-/-} - Mäuse.....	57
3.5.3 Einfluss der Infektion auf die Tg ^{+/-} -Mäuse: Geschlechterdifferenzen	60
3.6 Amyloid- β -Gehalt post infectionem	63
3.6.1 ELISA	63
3.6.2 Thioflavin-S-Färbung	64
4 Diskussion.....	66
4.1 Einfluss der intrazerebralen Infektion mit <i>E. coli</i> auf die kognitive Leistungsfähigkeit der transgenen Mäuse des Stammes Tg2576.....	66
4.2 Einfluss des Geschlechtes auf die Auswirkung einer <i>E. coli</i> -Meningitis bei den transgenen Mäusen des Stammes Tg2576.....	73
5 Zusammenfassung	77
6 Literaturverzeichnis	78

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid
AD	Alzheimer-Demenz (Alzheimer disease)
ANOVA	Analysis of variance
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (Amyloid-Precursor-Protein)
Aqua (bi-)dest.	einfach und doppelt destilliertes Wasser
AS	Aminosäuren
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
Asn	Aminosäure Asparagin
bpM	Basenpaar-Marker (DNA Ladder)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CFU	Koloniebildende Einheiten (Colony forming units)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/RNA	Desoxyribonukleinsäure/Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
g	Gramm; Erdbeschleunigung (gravity; 9,81 m/s ²)
h	Stunde
hAPP	humanes Amyloid-Vorläuferprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
K670N	Lysin an Position 670 durch Asparagin ersetzt
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
K ₂ S ₂ O ₅	Kaliumdisulfit
l	Liter

Leu	Aminosäure Leucin
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Aminosäure Lysin
M671L	Methionin an Position 671 durch Leucin ersetzt
Met	Aminosäure Methionin
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NZ	Nervenzellen
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tg ^{+/-}	Transgene Tiere des Stammes Tg2576
Tg ^{-/-}	Nicht-transgene Tiere des Stammes Tg2576
tgl.	täglich
vs.	versus
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

1 Einleitung

1.1 Prolog

Die Alzheimer-Demenz gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen, zu denen auch der Morbus Parkinson sowie die Amyotrophische Lateralsklerose gehören. Diese Krankheitsbilder sind sehr vielfältig und nehmen durch den demographischen Wandel mit der stetig alternden Bevölkerung einen immer größer werdenden Stellenwert ein, da ein hohes Lebensalter für die AD sowie den Morbus Parkinson einen der größten Risikofaktoren darstellt (Cummings et al. 1998; Pike et al. 2006; Rocca et al. 1986; Wallesch und Förstl 2005). Die genaue Analyse der Entstehungsmechanismen sowie die Identifizierung von Faktoren, die die Erkrankungen hervorrufen bzw. ihren Progress fördern, werden demnach immer wichtiger.

Ein Faktor, der im Mittelpunkt vieler Studien steht, ist der massive Nervenzelluntergang, der bei den neurodegenerativen Erkrankungen auftritt. Die genauen Mechanismen, die zum Verlust der neuronalen Zellen führen, sind nach wie vor nicht vollständig geklärt. Einige Studien konnten eine inflammatorische Komponente im zentralen Nervensystem der Patienten nachweisen (Akiyama 1994; Amor et al. 2010; Bamberger und Landreth 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass starke inflammatorische Stimuli im Sinne von Lipopolysacchariden den Progress einer bestehenden neurodegenerativen Erkrankung beschleunigen können (Combrinck et al. 2002). Aus diesem Grund soll in der vorliegenden Arbeit im Tierexperiment der Zusammenhang zwischen einer Infektion und der Progression einer bestehenden neurodegenerativen Erkrankung näher untersucht werden.

Die inflammatorische Komponente bei den neurodegenerativen Erkrankungen besteht aus aktivierten Mikrogliazellen und Entzündungsmediatoren. Damit ähnelt der Prozess jenem, der bei der Reaktion auf einen von außen eingedrungenen Erreger auftritt. Bei den neurodegenerativen Erkrankungen scheint diese Reaktion jedoch unabhängig von der Präsenz eines Erregers permanent aktiviert zu sein (McGeer PL und McGeer EG 1995). Trotz der spezifischen Ausrichtung der Immunantwort gegen bestimmte Erreger kommt es auch bei der Reaktion auf fremde Mikroorganismen zu Schädigungen körpereigener Zellen, wie zum Beispiel der Nervenzellen. Demnach könnte die dauerhafte inflammatorische Komponente neurodegenerativer Erkrankungen ebenfalls eine der Ursachen des Nervenzelluntergangs sein. In Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten, die unter einem Morbus Alzheimer leiden, besonders häufig durch systemische Infektionen ein Delirium entwickeln (Holmes et al. 2003). Diese Anfälligkeit für die Entwicklung eines

Deliriums deutet auf eine erhöhte Empfindlichkeit des ZNS der AD-Patienten gegenüber systemischen inflammatorischen Reaktionen hin. Eine Theorie ist, dass die bereits voraktivierten Mikrogliazellen stärker und schneller auf einen Erreger reagieren können, gleichzeitig aber auch hirneigene Zellen in stärkerem Maße schädigen (Holmes und Cotterell 2009).

Wie genau dieser Zusammenhang zu werten ist und inwiefern sich die akute Allgemeinverschlechterung auf den gesamten Krankheitsprozess der AD auswirkt, soll mit Hilfe der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

1.2 Alzheimer-Demenz

1.2.1 Allgemeines

Die AD zählt zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Sie ist eines der häufigsten Krankheitsbilder aus dem neuropsychiatrischen Bereich und der häufigste Grund für kognitive Beeinträchtigungen des älteren Menschen (Hsiao et al. 1996). Die initiale Symptomatik besteht meist aus einem progredienten Gedächtnisverlust sowie Orientierungsstörungen (Hardy und Allsop 1991). Des Weiteren sind histopathologische Veränderungen für die AD charakteristisch. Diese Veränderungen umfassen einen Synapsen- und Nervenzellverlust, welcher mit einer Hirnatrophie vor allem im Bereich des Hippokampus einhergeht (Bayer und Wirths 2008). Zum anderen ist die AD durch das Vorhandensein von extrazellulären senilen Plaques und intrazellulären neurofibrillären Tangles gekennzeichnet (Masuhr und Neumann 2007).

Die neurofibrillären Tangles bestehen aus einem abnorm phosphorylierten Fragment des Tau-Proteins (Hardy und Allsop 1991). Sie befinden sich vor allem in Neuronen des medialen Temporallappens (Buckner et al. 2005). Die Neurofibrillenbündel führen zum Tod der NZ. Ihre Anwesenheit korreliert besser mit der Schwere der Demenz als die Dichte der Plaques. Dennoch gelten die Tangles nicht als die Hauptursache der AD, da sie auch bei anderen Erkrankungen wie der progressiven supranukleären Blickparese auftreten können (Cummings et al. 1998).

Die neuritischen Plaques, die vor allem in der hippocampalen Formation sowie im Neokortex vorkommen, besitzen einen Kern aus β -Amyloid-Peptiden, der von mehreren dystrophischen Nervenzellen umgeben ist. Außerdem können in der Peripherie der Plaques Astrozyten und Mikrogliazellen vorgefunden werden. Der Durchmesser eines Plaques beträgt ca. 50 bis 200 μm (Cummings et al. 1998). Die β -Amyloid-Peptide des Kerns

entstehen durch enzymatische Spaltung aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) (Kang et al. 1987; Mattson 1997). Die extrazellulären β -Amyloid-Plaques sind spezifischer als die Tangles, da sie vor allem bei der AD sowie bei der normalen Alterung des menschlichen Gehirns vorkommen (Cummings et al. 1998).

Die Früherkennung der AD ist sehr wichtig, da die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen so früh wie möglich begonnen werden sollte, um die Progredienz kognitiver Defizite zu verzögern (Wallesch und Förstl 2005). Zur Diagnostik stehen verschiedene klinische Tests zur Verfügung, wie beispielsweise der Mini-Mental-Status-Test, der zur Abschätzung des Schweregrades der kognitiven Beeinträchtigung genutzt werden kann (Folstein et al. 1975). Neben den neuropsychologischen Testverfahren können postmortal im Gehirn-Präparat histopathologische Veränderungen gefunden werden. Für die Diagnosestellung AD müssen sowohl die Tangles als auch die neuritischen Plaques vorhanden sein (Cummings et al. 1998). Prämortal kann das Verhältnis der Amyloid- β -Spiegel als Marker zur Abschätzung des Risikos einer AD herangezogen werden (Koyama et al. 2012).

Der Morbus Alzheimer ist eine Erkrankung des höheren Alters. Er manifestiert sich meist erst nach dem 65. Lebensjahr, kann aber in manchen Fällen auch schon früher auftreten und wird dann als präsenile Demenz bezeichnet. Diese Demenzform zeigt eine wesentlich raschere Progression (Choo et al. 2011) und steht öfter im Zusammenhang mit bestimmten autosomal-dominant vererbten Mutationen. Diese Mutationen betreffen die Gene für APP, Präsenilin-1 oder Präsenilin-2 (Kawarabayashi et al. 2001). Die Häufigkeit der Mutationen unter den AD-Patienten liegt allerdings bei unter 5% (Cummings et al. 1998). Dennoch war die Entdeckung dieser Mutationen ein Fortschritt für die Wissenschaft. Durch das Wissen um die Mutationen kam man der Entschlüsselung des Entstehungsmechanismus der AD ein Stück näher. Des Weiteren bot es die Möglichkeit, transgene Mausmodelle zur Erforschung der AD zu entwickeln. Ein weiterer Aspekt, der durch die Entdeckung der Mutationen aufgedeckt werden konnte, ist der Zusammenhang zwischen der Demenz bei Down-Syndrom-Patienten und der AD. Die histopathologischen Veränderungen in Gehirnen von Patienten mit Trisomie 21 ähneln denen der AD-Patienten (Kang et al. 1987). Diese Ähnlichkeit resultiert aus der Tatsache, dass sich das Gen für APP auf dem Chromosom 21 befindet. Durch die dreifache Anzahl dieses Chromosoms bei Down Syndrom-Patienten entsteht eine Überexpression von APP (Hsiao et al. 1995), sodass es bereits im 40. Lebensjahr zur Entwicklung einer AD kommen kann (Hardy und Allsop 1991).

1.2.2 Historische Entwicklung

Die Alzheimer-Forschung begann im Jahre 1906 mit der Veröffentlichung des Falles Auguste D. durch Alois Alzheimer während eines Vortrages in Tübingen und der anschließenden Publikation „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer 1907; Stelzmann et al. 1995). Durch die postmortale Untersuchung des Gehirns entdeckte er die für die AD typischen neuronalen Tangles sowie die Amyloid-Plaques. Die Beschreibung der histopathologischen Entdeckungen zusammen mit der klinischen Symptomatik seiner Patientin führte 1910 zur Namensgebung der „Alzheimer“-Demenz durch Emil Kraepelin (Hardy 2006). In den folgenden Jahrzehnten wurde versucht, die Ursache dieser Erkrankung aufzuklären, um den Weg für eine geeignete Therapie zu bahnen. Die Therapie der AD beruhte lange Zeit zum großen Teil auf der Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration im Gehirn. Dieser Neurotransmitter wird im Nucleus basalis Meynert produziert, der schon frühzeitig im Verlauf der AD betroffen ist. Durch den Zellverlust in diesem Kerngebiet kommt es zu einer verminderten Produktion des Transmitters. Das Defizit der Acetylcholin-Synthese korreliert mit der Schwere der AD (Cummings et al. 1998). Aus diesem Grund kann eine Therapie mit Acetylcholinesterase-Hemmstoffen die Symptome der AD teilweise mildern. Diese symptomatische Therapie behebt allerdings nicht die Ursache der AD. Durch die Entdeckung des APP als Vorläufer des Amyloid- β sowie der Mutation des APP-Gens in Familien mit gehäuft auftretender AD wurde die Idee geschaffen, dass das Neurotransmitter-Ungleichgewicht durch den pathologischen Abbau des APPs bzw. die Ablagerung von Amyloid- β entsteht (Hardy und Allsop 1991). Ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen Schwere der Demenz und Dichte der neuritischen Plaques konnte allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden (Cummings et al. 1998). Es wird vermutet, dass sowohl die Synapsenverluste, die durch die Plaques mit bedingt sind, als auch der Tod jener Neurone, die Tangles aufweisen, zum dementiellen Syndrom beitragen und dass auch die Neurotoxizität sowie die proinflammatorische Aktivität der APP-Fragmente ursächlich beteiligt sind (Hardy und Allsop 1991; Lotz et al. 2005).

1.2.3 Amyloid- β -Kaskade

Eine eindeutige Korrelation zwischen den β -Amyloid-Plaques und der Schwere der Demenz konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden, allerdings wurde nachgewiesen, dass die A β -Peptide neurotoxisch sind und zu einem Zellverlust führen können (Cummings et al. 1998; Deshpande et al. 2006). Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass A β -Peptide

in geringer Menge auch bei gesunden Menschen vorkommen. Dementsprechend ist nicht allein ihre Anwesenheit die Ursache der AD, sondern die vermehrte Produktion (Chartier-Harlin et al. 1991). Durch die Entdeckung der A β -Kaskade und damit des Entstehungsmechanismus der Plaques konnte die Pathogenese teilweise geklärt werden. Die Peptide werden aus dem Transmembranprotein APP abgespalten. Das Gen für das APP-Molekül befindet sich auf dem Chromosom 21. Die genaue Funktion des APP-Moleküls ist unklar. Es scheint in das Zellwachstum sowie in den Zell-Zusammenhalt einzugreifen (Hardy und Allsop 1991). Der normale enzymatische Abbau des APP-Moleküls geschieht ohne Plaque-Bildung über eine α -Sekretase. Für die Entstehung der neurotoxischen A β -Peptide der Plaques ist ein alternativer Spaltungsweg verantwortlich, der über eine β - sowie eine γ -Sekretase verläuft (Mattson 1997). Dieser Weg ist bei der familiären AD vermehrt aktiv (Cummings et al. 1998). Durch die Spaltung entstehen mehrere Spaltprodukte. Das Häufigste ist das aus 40 Aminosäuren bestehende β -Amyloid-Peptid A β -1-40. Das zweithäufigste Spaltprodukt ist das A β -1-42, welches 5-15% der Peptide ausmacht (Kawarabayashi et al. 2001). Es besitzt 42 Aminosäuren, von denen die zwei zusätzlichen AS lipophil sind, wodurch sich wesentlich leichter stabile Aggregate bilden können. Alle bekannten Mutationen, die die AD verursachen, erhöhen die Produktion von A β , vor allem des A β -1-42 (Cummings et al. 1998). Wie genau und ob das A β zur Symptomatik beiträgt, ist unklar, allerdings ist sicher, dass es die Funktion der Nervenzellen negativ beeinflusst und zu oxidativen Schäden führt (Cummings et al. 1998). Weiterhin deutet die Tatsache, dass die bekannten Mutationen zu einem drastisch erhöhten A β -Peptid-Spiegel im Gehirn und damit auch zu einer erhöhten A β -Ablagerung führen, darauf hin, dass die Peptid-Aggregate eine wichtige Rolle spielen könnten (King und Arendash 2002). Aus diesem Grund stellt die Entwicklung neuer Medikamente, die die A β -Bildung verhindern sollen, zum Beispiel durch die Beeinflussung der Sekretasen des APP-Abbaus (Cummings et al. 1998), einen wichtigen Ansatzpunkt in der Therapie der AD dar. Dennoch ist fraglich, ob die Beeinflussung der A β -Ablagerung den gewünschten Erfolg erzielen wird, da viele Studien keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Demenz-Schwere und Plaque-Dichte zeigen konnten.

1.2.4 Inflammatorische Komponente

Die Ursache der AD konnte bislang immer noch nicht vollständig geklärt werden. Bis heute beschränkt sich die Therapie der AD weiterhin auf Cholinesterase-Inhibitoren wie Donepezil und Rivastigmin, welche die Symptomatik der AD verbessern, allerdings nicht den Progress der AD aufhalten können. Ein weiterer wichtiger Behandlungsansatz vor

allem in den frühen Stadien der AD stellt die Gabe von Memantinen dar. Memantine sind Glutamat-Antagonisten und wirken über die Inhibierung der NMDA-Kanäle neuroprotektiv (Amor et al. 2010; Wallesch und Förstl 2005). Allerdings kann die bereits bestehende Symptomatik durch keines der zur Verfügung stehenden Medikamente aufgehoben werden (Cummings et al. 1998). Primäres Ziel ist es folglich zurzeit noch, die Lebensqualität bestmöglich zu steigern und den Progress der Erkrankung hinauszuzögern. Eine Heilung ist mit den zur Verfügung stehenden Möglichkeiten noch nicht erreichbar.

Ein aufschlussreicher Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten ist die Beobachtung, dass in den neuritischen Plaques Akute-Phase-Proteine, aktivierte Mikrogliazellen und ein aktiviertes Komplement-System nachgewiesen werden können (Cummings et al. 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass nicht nur in den Plaques von AD-Patienten Zeichen einer inflammatorischen Reaktion auftreten, sondern dass allgemein bei den neurodegenerativen Erkrankungen immer auch eine inflammatorische Komponente gefunden werden kann. Diese Komponente betrifft v.a. die Mikrogliazellen, die bei den Erkrankungen selektiv aktiviert sind (Akiyama 1994; Cunningham et al. 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl dieser Mikrogliazellen mit einem Krankheits-Progress assoziiert ist (Van Everbroeck et al. 2004). Ein weiterer aufschlussreicher Punkt ist, dass sich eine längerfristige Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika positiv auf den Verlauf der AD (in t' Veld et al. 2001; Stewart et al. 1997; Vlad et al. 2008) bzw. anderer neurodegenerativer Erkrankungen auswirken kann (Chen et al. 2005; Cummings et al. 1998). Außerdem konnten Mackenzie et al. zeigen, dass die langfristige Einnahme nicht-steroidaler Antirheumatika zu einer signifikanten Reduktion der Mikroglia-Aktivität in den Gehirnen von AD-Patienten führt (Mackenzie und Munoz 1998). Aus diesem Grund rückt die inflammatorische Komponente, die sich in den Gehirnen der Patienten antreffen lässt, immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung.

Zudem konnte beobachtet werden, dass sich eine bakterielle Infektion negativ auf den Verlauf einer AD auswirken kann. Häufig verursacht eine derartige Infektion ein Delir bei den AD-Patienten (Elie et al. 1998). Durch das Delir entsteht ein sehr schneller Verlust der kognitiven Fähigkeiten (Murray et al. 1993). Dieser Verlust bildet sich häufig nur unvollständig zurück (Perry et al. 2007), weshalb die kognitive Verschlechterung bei den AD-Patienten, die mit einer systemischen Infektion einhergeht, meist über die Phase der Infektion hinaus persistiert (Holmes et al. 2009). Diese Beobachtung verdeutlicht die enorme Wichtigkeit der entzündlichen Prozesse im Gehirn der AD-Patienten.

1.3 Bakterielle Meningitis

Infektionen des ZNS durch pathogene Erreger verursachen vielerlei Symptomatik. Diese Symptome sowie die Langzeitschäden einer zentral-nervösen Infektion beruhen jedoch nicht allein auf dem Vorhandensein und der Aggressivität der Erreger, sondern werden auch durch den Wirt selbst mit verursacht.

Eine intrakranielle Infektion kann verschiedene Strukturen des Gehirns betreffen. Zum einen können die Gehirnhäute, wie die Pia mater und die Arachnoidea betroffen sein, was einer Meningitis entspricht. Zum anderen kann das Parenchym des Gehirns selbst betroffen sein, in diesem Fall handelt es sich um eine Enzephalitis oder um einen Hirnabszess.

1.3.1 Epidemiologie und Symptomatik

Obwohl bei einer Enzephalitis direkt die Gehirnsubstanz betroffen ist und bei der Meningitis nur die umgebenden Strukturen, ist die akute bakterielle Meningitis nach wie vor mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert (Durand et al. 1993). Die hohe Sterblichkeit sowie die häufigen Spätfolgen haben sich trotz der zahlreichen neuentwickelten Antibiotika nicht adäquat verbessert (Nau et al. 1999b). Weltweit treten pro Jahr etwa 600.000 Meningitis-Fälle auf, von denen circa 180.000 Menschen an den Folgen der Erkrankung versterben (Nau und Brück 2002).

Die klassische klinische Manifestation einer akuten bakteriellen Meningitis besteht aus der Trias Fieber, Nackensteife und Bewusstseinsintrübung (Durand et al. 1993). Weitere Symptome sind Kopfschmerzen, Übelkeit, Hirnnervenausfälle, Verwirrtheit, Schläfrigkeit und Koma (Carpenter und Petersdorf 1962). Die beiden letzten Symptome werden auch als Lethargie bezeichnet, welche bei ca. 50% der Patienten auftritt (Durand et al. 1993). Des Weiteren können als Zeichen einer neurologischen Schädigung epileptische Anfälle, Ataxien und Lähmungen bis hin zu einer Hemiparese beobachtet werden. Die wichtigste diagnostische Untersuchungsmethode bei Verdacht auf eine bakterielle Meningitis stellt die Liquorpunktion dar. Dabei stellt sich eine bakterielle Meningitis typischerweise durch das Vorhandensein eines trüben Liquors, einer Eiweißerhöhung sowie einer neutrophilen Granulozytose dar. Des Weiteren kann bei zahlreichen Patienten ein erhöhter intrakranieller Druck beobachtet werden. Im peripheren Blut lassen sich im Falle einer Sepsis Entzündungszeichen wie ein erhöhtes Laktat nachweisen. Die genannte klinische Manifestation der akuten Meningitis wird nicht allein durch die Bakterien verursacht, sondern ist zu einem erheblichen Teil durch den Wirt selber bedingt (siehe unten).

Neben den akuten Symptomen aufgrund von Meningitiden treten häufig auch Spätfolgen auf. Diese Langzeitprobleme betreffen oft das Gedächtnis sowie die Lernfähigkeit. Weiterhin können postmortal degenerative Veränderungen im Sinne eines Nervenzellverlustes im Bereich des Hippokampus gefunden werden (Nau et al. 1999a). Es konnte in Tierexperimenten nachgewiesen werden, dass dieser Zellverlust vor allem in der frühen Phase einer bakteriellen Meningitis auftritt (Zysk et al. 1996). Diese Veränderungen deuten darauf hin, dass nicht alleine die bakteriellen Bestandteile und deren Toxizität für die Folgen verantwortlich sein können, da sich die Bakterien bei einer Meningitis größtenteils im Liquor sowie den Meningen befinden. An der Entstehung der Spätfolgen sowie der akuten Symptomatik müssen also weitere Faktoren beteiligt sein.

1.3.2 Pathophysiologie und Therapie

Die meisten bakteriellen Meningitiden entstehen durch Bakterien der Schleimhaut des Nasopharynx, der Nasennebenhöhlen, der Lunge sowie des Mittelohres (Nau und Brück 2002). Die Bakterien gelangen durch eine hämatogene Ausbreitung zum ZNS. Dort penetrieren sie durch verschiedene Mechanismen die Blut-Hirn-Schranke und erreichen so den Subarachnoidalraum. Aufgrund der geringen Konzentration an Leukozyten und anderen Abwehrmechanismen im Liquor können sich manche Bakterien in diesem Kompartiment ideal vermehren (Nau und Brück 2002). Durch unterschiedliche Ursachen kommt es dann zum Untergang neuronaler Zellen des Wirtes. Zum einen sezernieren die Bakterien toxische Verbindungen, die direkt die umliegenden Zellen schädigen. Zu diesen Verbindungen gehört unter anderem Pneumolysin, welches bei Meningitiden durch *Streptococcus pneumoniae* freigesetzt wird und zu einem Untergang von Nervenzellen führt (Stringaris et al. 2002). Aber auch andere Hämolysine führen direkt zu einer Schädigung neuronaler Zellen. Zum anderen werden proinflammatorische Mediatoren freigesetzt, die zu einer starken Abwehrreaktion des Wirtes führen. Diese Abwehrreaktion besteht aus der Reaktion der glialen Zellen sowie angelockter Leukozyten. Durch die Stimulation der Astrozyten und Mikrogliazellen kommt es zu einer Ausschüttung von freien Radikalen sowie Aminosäuren, um die Erreger zu eliminieren. Dieser körpereigene Schutz des Wirtes schadet allerdings nicht nur den Erregern, sondern auch dem Wirt durch die Zerstörung neuronaler Zellen (Braun et al. 1999). Dadurch entstehen nicht nur die klinische Manifestation der akuten bakteriellen Meningitis, sondern auch die Spätfolgen im Sinne von kognitiven Beeinträchtigungen, die über mehrere Jahre hinweg persistieren können (Grimwood et al. 2000).

Die eingewanderten Leukozyten werden ebenfalls für die Beseitigung der Erreger benötigt. Durch die Einwanderung und die Reaktion der Leukozyten kommt es allerdings auch zu einer Beschädigung der endothelialen Zellen der Gefäße und damit verbunden zu einer Vaskulitis sowie zu Gefäßverschlüssen. Diese Reaktion führt zu einem ischämischen Nervenzelluntergang, der wiederum ein zytotoxisches Ödem verursachen kann (Nau und Brück 2002).

Doch nicht alleine die Virulenz des Erregers und die Antwort des Wirtes auf die Bakterien spielen bei der Entwicklung von Folgeschäden eine Rolle. Auch der Einsatz von Antibiotika beeinflusst den Verlauf der Meningitis und der möglichen Folgen. Durch die Entwicklung der Cephalosporine der dritten Generation konnte die Letalität der durch gramnegative Bakterien verursachten Entzündung der Leptomeningen deutlich gesenkt werden. Doch trotz des sehr wirksamen Antibiotikums liegt die Letalität bei einigen Erregern wie dem *Streptococcus pneumoniae* weiterhin über 20% (Durand et al. 1993). Einer der Gründe für die Diskrepanz zwischen der starken Wirksamkeit der Antibiotika und der immer noch hohen Letalität der Erkrankung liegt in der Wirkweise der Antibiotika und der Eigenschaften der Bakterien. Anders als grampositive Bakterien besitzen die gramnegativen Bakterien eine wesentlich dünnere Wand, die nur aus einer Mureinschicht sowie einer äußeren Membran besteht. In dieser Membran sind die sogenannten Lipopolysaccharide (LPS) verankert. Diese LPS bestehen zum Teil aus Lipid-A, welches bei dem Zerfall der Bakterien freigesetzt wird und zum septischen Schock führen kann (Fuchs und Schlegel 2007; Gross 2009). Diese Bestandteile des LPS sind als Endotoxine für die inflammatorische Aktivität des LPS verantwortlich (Nau und Eiffert 2002). Durch diese proinflammatorischen Zellwandbestandteile kommt es zu einer Erhöhung der Mortalität (Nau et al. 1999b), unter anderem durch die Induktion der Zytokinbildung und der damit verbundenen Verstärkung der meningealen Inflammation. Unter den Zytokinen sind vor allem das Interleukin 6 und Interleukin 1 β für die Abwehrreaktion von Bedeutung (Holmes et al. 2003). Durch die Entzündung der Meningen kommt es zu einem Hirnödem, welches über eine Erhöhung des intrakraniellen Druckes zu einer letalen Herniation oder zu bleibenden neurologischen Schäden führen kann (Nau et al. 1999b). Durch eine Therapie mit den auf proliferierende Zellen bakterizid wirkenden β -Lactam-Antibiotika, die den Aufbau der Bakterienwand beeinträchtigen, kommt es zu einem Zerfall der Bakterien (Lüllmann et al. 2010). Dieser plötzliche Zell-Zerfall führt zu einer drastischen Erhöhung der bakteriellen Wand-Komponenten im Liquor, wodurch es sehr schnell zu einer massiven Entzündungsreaktion kommt. Dies führt wiederum zu einer drastischen

Erhöhung des intrakraniellen Druckes und kann dadurch zum Tod führen. Dementsprechend wirkt sich die antibiotische Therapie mit Penicillinen oder Cephalosporinen nicht nur positiv auf eine Meningitis aus. Aus diesem Grund wird die Verwendung anderer Antibiotika, wie Rifampicin (Nau et al. 1999b), oder die Gabe von Glukokortikosteroiden, wie Dexamethason, die bereits eingesetzt werden, diskutiert. Der Einsatz der Glukokortikosteroide ist jedoch kritisch zu sehen, da der Nutzen noch nicht eindeutig bewiesen ist (Bone et al. 1987). Des Weiteren konnte in tierexperimentellen Versuchen ein vermehrter Untergang von Neuronen in der hippokampalen Formation bei der Verwendung von Dexamethason beobachtet werden (Spreer et al. 2003; Zysk et al. 1996)

1.3.3 *Escherichia-coli*-Meningitis

Das Bakterium *E. coli* ist ein gramnegatives Stäbchen-Bakterium und gehört somit der größten Gruppe medizinisch relevanter Bakterien an. Die Spezies *E. coli* gehört zur Gattung *Escherichia*, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehört. Es ist ein fakultativ pathogener Erreger, der je nach Subtyp Bestandteil der natürlichen Darmflora oder Ursache lebensbedrohlicher Erkrankungen sein kann. Als Bestandteil der Darmflora ist er oft die Ursache nosokomialer Infektionen. Die Übertragung erfolgt bei den Darmkeimen zumeist fäkal-oral. In der Spezies der *E. coli* gibt es jedoch viele Subtypen, die sich anhand ihrer Virulenzfaktoren voneinander unterscheiden. Der Subtyp *E. coli* K1, der für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, trägt seinen Namen aufgrund des speziellen K-Antigens. Dieses K1-Antigen besteht aus Kohlenhydraten, die sich in der äußeren Membran des Bakteriums befinden (Schiffer et al. 1976). Sie werden auch Kapsel-Antigene genannt. Das K1-Antigen ist besonders auf *E. coli*-Stämmen zu finden, die gravierende Erkrankungen wie Meningitiden und Pyelonephritiden auslösen (Hahn et al. 2009). Das K1-Antigen hat eine ähnliche Struktur wie das Kapselpolysaccharid der Gruppe B-Meningokokken (Glode et al. 1977). Es schützt das *E. coli*-Bakterium vor der Beseitigung durch Phagozytose und ist für die Invasivität des Erregers mitverantwortlich (Schiffer et al. 1976). *E. coli* K1 verursacht etwa die Hälfte aller neonatalen Infektionen und ist einer der häufigsten Erreger der Meningitiden im Neugeborenen-Alter (Korhonen et al. 1985; Pluschke et al. 1983).

Das Bakterium *E. coli* ist der häufigste Grund für eine Meningitis bzw. eine Septikämie des Neugeborenen (Korhonen et al. 1985). Durch das Vorkommen des Bakteriums als Kommensale der Darmflora kann es bei der Geburt zu einer Übertragung auf das Neugeborene kommen. Bei Erwachsenen ist die *E. coli*-Meningitis seltener. Die häufigsten

Erreger der ambulant erworbenen bakteriellen Meningitis beim älteren Menschen sind Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*), Meningokokken (*Neisseria meningitidis*) sowie *Listeria monocytogenes*. Diese Erreger spielen jedoch bei der nosokomialen Meningitis eher eine untergeordnete Rolle. Hier liegt das Erregerspektrum eher bei den gramnegativen Bakterien, wobei es sich vor allem um Klebsiellen sowie *E. coli*-Bakterien handelt (Durand et al. 1993).

Die Ursache für das geringe Vorkommen der *E. coli*-Meningitis in der normalen Bevölkerung ist die etwas schwächere Virulenz des Bakteriums. Unter den Neugeborenen, die aufgrund der intrapartalen Übertragung des Bakteriums Symptome aufweisen, entwickeln nur wenige der Kinder eine manifeste Meningitis (Glode et al. 1977). Gerade dieser Faktor wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um eine möglichst lange inflammatorische Reaktion im ZNS zu erzeugen, da aufgrund der geringen Virulenz die Versuchstiere relativ lange ohne Therapie überleben konnten.

1.4 Einfluss einer Infektion auf die Neurodegeneration

Den neurodegenerativen Erkrankungen ist gemeinsam, dass sie mit einer langsam progredienten Verschlechterung der Symptomatik einhergehen, wobei sich die Symptome der verschiedenen Erkrankungen sehr stark unterscheiden. Zum einen betreffen sie Bewegungsstörungen, zum anderen dominieren wie bei der AD eher die kognitiven Defizite. Die klinische Manifestation entsteht vor allem aufgrund eines fortschreitenden Nervenzellverlustes. Viele Studien konnten einen Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen in den Gehirnen der Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen beobachten (Perry et al. 2003; Perry et al. 2007; Whitton 2007). Diese inflammatorischen Prozesse ähneln denen, die bei einer systemischen Infektion auftreten. Viele Faktoren stehen unter dem Verdacht, in den Gehirnen der Patienten proinflammatorisch zu wirken. Dies sind unter anderem Protein-Aggregate, wie das Amyloid- β der AD-Patienten, sowie Moleküle, die von den absterbenden Neuronen freigesetzt werden. Außerdem wird über eine fehlende Regulierung der inflammatorischen Kontroll-Mechanismen diskutiert (Holmes et al. 2003; Wyss-Coray und Mucke 2002). Ein Indiz dafür, dass es sich womöglich auch um eine Dysregulation der inflammatorischen Komponenten handeln könnte, ist die Beobachtung, dass eine systemische Infektionen bei Patienten mit einer neurodegenerativen Erkrankung durch eine Entzündungsreaktion im ZNS zu einer Verschlechterung der Symptomatik führt (Perry et al. 2003; Perry et al. 2007). Als Grund wird das Vorhandensein eines bereits voraktivierten Immunsystems im ZNS diskutiert

(Holmes et al. 2003), welches durch eine Infektion zusätzlich aktiviert wird und damit zu einer Verschlechterung der Symptomatik führt. Die wichtigsten Zellen des Immunsystems scheinen in diesem Zusammenhang die Mikroglia zu sein, durch deren Aktivierung es zu einer Neuronenschädigung kommt (Perry et al. 2007). Mikrogliazellen sind die wichtigsten Zellen des Immunsystems im Gehirn und stellen die Makrophagen des ZNS dar (Aloisi 2001; Kettenmann et al. 2011; Wyss-Coray und Mucke 2002). Bei Infektionen sowie bei Schädigung von Gehirngewebe werden die Mikrogliazellen aktiviert (Kettenmann et al. 2011). Durch die ständige Reizung der Nervenzellen in Gehirnen von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen werden dementsprechend auch die Mikroglia kontinuierlich durch die A β -Peptide aktiviert (Lotz et al. 2005). Dadurch kommt es zu einer permanenten inflammatorischen Komponente im ZNS, die an der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist (Amor et al. 2010).

Bei einer systemischen Infektion reagiert der Körper mit einer systemischen Immunantwort. Diese Reaktion führt über verschiedene Wege auch zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen des ZNS. Dies geschieht unter anderem durch die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokinen aus aktivierten Makrophagen sowie zerstörten Zellen. Die aktivierten Mikrogliazellen schütten ebenfalls eine Reihe proinflammatorischer Faktoren wie Interleukine und Tumor-Nekrose-Faktor α sowie zytotoxische Faktoren wie Superoxid und Stickstoffmonoxid aus (Block und Hong 2005). Durch die bereits bestehende Vor-Aktivierung der Mikrogliazellen bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen sind diese wesentlich reaktiver und verursachen eine stärkere und aggressivere Immunantwort im ZNS im Vergleich zu gesunden Menschen. Diese Immunantwort besteht einerseits aus der erwähnten Zytokinausschüttung sowie andererseits aus einer verstärkten Phagozytose von Neuronen, was beides zu einer neuronalen Schädigung führt. In vitro konnte bereits belegt werden, dass das gleichzeitige Vorhandensein von A β ₄₀ und LPS zu einer synergistischen Aktivierung der Mikrogliazellen führt (Lotz et al. 2005; Schütze et al. 2012). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Stickstoffmonoxid- sowie Zytokin-Freisetzung resultiert (Lotz et al. 2005). Die akute Verstärkung einer beständigen Entzündung im ZNS von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen, die durch eine systemische Infektion auftritt, könnte dementsprechend durch eine verstärkte Aktivierung der Mikrogliazellen und den damit verbundenen Nervenzelluntergang zu einem Progress der Erkrankungen führen.

Bisher gibt es nur wenige tierexperimentelle Studien, die eine Verschlechterung der neurodegenerativen Erkrankungen durch eine bakterielle Infektion bestätigen. Es gibt jedoch klinische Studien, die vor allem bei Patienten mit AD belegen, dass eine systemische Infektion die Erkrankung dauerhaft verschlechtern kann (Holmes et al. 2003; Holmes et al. 2009). Diese klinischen Beobachtungen konnten durch tierexperimentelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe jedoch nicht belegt werden. Sowohl eine systemische (Ebert et al. 2010) als auch eine intrazerebrale Infektion (bisher noch unpublizierte Daten) mit dem häufigsten Erreger ambulant erworbener bakterieller Meningitiden sowie zahlreicher respiratorischer Infekte, *Streptococcus pneumoniae*, führen weder zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten in der Akutphase der Infektion noch zu längerfristigen Auswirkungen auf transgene AD-Mäuse. Allerdings konnte in einem anderen Mausmodell ein negativer Einfluss des LPS als Bestandteil der Bakterienwand gramnegativer Bakterien auf den Verlauf einer Prionerkrankung gezeigt werden. Hier zeigte sich nach der intraperitonealen Injektion einer hohen Dosis LPS eine Progression der Neurodegeneration sowie eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten (Combrinck et al. 2002; Cunningham et al. 2005; Cunningham et al. 2009). Des Weiteren zeigte sich in einem Mausmodell der ALS ebenfalls ein negativer Einfluss einer intraperitonealen Injektion mit LPS (Nguyen et al. 2002). Aufgrund dessen wurde die Infektion der transgenen AD-Mäuse in der vorliegenden Arbeit anstatt mit einem grampositiven Bakterium wie dem *Streptococcus pneumoniae* mit einem gramnegativen Erreger durchgeführt. Da *Escherichia coli* ein häufiger Erreger von Infektionen bei älteren hospitalisierten Patienten ist, wurde dieses Bakterium für die weiteren Versuche benutzt. Zudem konnten Barrientos et al. zeigen, dass eine periphere Infektion mit *E. coli* bei älteren nicht-transgenen Mäusen zu einer Beeinträchtigung der hippokampalen Gedächtnis-Konsolidierung führt (Barrientos et al. 2006). Für die Versuche der vorliegenden Arbeit traf man die Entscheidung zur intrazerebralen Injektion, um eine stärkere ZNS-Entzündung hervorzurufen sowie die bereits aktivierten Mikrogliazellen direkt beeinflussen zu können. Dadurch sollte untersucht werden, ob sich die klinischen Beobachtungen experimentell in einem Mausmodell mit einer echten Infektion bestätigen lassen.

1.5 Ziele der Arbeit

Neurodegenerative Erkrankungen, wie die AD, stellen durch den demographischen Wandel ein immer größer werdendes Problem dar. Die klinischen Beobachtungen, dass sich bakterielle Infektionen negativ auf eine bestehende neurodegenerative Erkrankung auswirken, deuten auf eine erhöhte Vulnerabilität der Neurone gegenüber Infektionen hin.

Verantwortlich für diese erhöhte Anfälligkeit könnten eine synergistische Aktivierung von Mikrogliazellen und der damit verbundene Nervenzellverlust durch das bei der AD vorkommende A β sowie zusätzliche bakterielle Bestandteile sein.

In vorherigen Experimenten konnte mit Hilfe von Tierexperimenten nie eindeutig belegt werden, dass sich eine bestehende neurodegenerative Erkrankung durch eine bakterielle Infektion verschlechtert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich hohe Dosen LPS negativ auf den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen auswirken. Diese unphysiologisch hohen Dosen werden bei echten Infektionen jedoch kaum erreicht, dennoch konnte dadurch gezeigt werden, dass sich bakterielle Bestandteile negativ auf den Verlauf auswirken können.

Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit ist es, den Einfluss einer intrazerebralen Infektion mit dem Bakterium *Escherichia coli* auf den Verlauf einer neurodegenerativen Erkrankung im Mausmodell zu untersuchen. Dabei wollen wir eine mögliche Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten der transgenen Tg2576-Mäuse, welche ein mutiertes APP überexprimieren und humanähnliche A β -Plaques aufweisen, durch eine Infektion untersuchen, um die in den vorherigen Experimenten nachgewiesenen Effekt des LPS auf den Verlauf einer neurodegenerativen Erkrankung auch mit Hilfe einer echten Infektion zu überprüfen. Dabei sollten die Mäuse intrazerebral infiziert werden, da eine systemische Infektion nicht lange genug von den Mäusen überlebt wird, um eine ausreichende Inflammation im ZNS zu erreichen. Des Weiteren können dadurch die bakteriellen Bestandteile inklusive des LPS direkt an den Zellen des ZNS wirken. Zum Vergleich sollten zusätzlich nicht-transgene Mäuse infiziert werden, um die Bedeutung der Transgenität zu untersuchen. Die Beurteilung des Verlaufs der Erkrankung erfolgte mit Hilfe des neuropsychologischen Testes „Morris Water Maze“ und motorischen Tests und wurde mit den Leistungen nicht-infizierter Mäuse verglichen. Des Weiteren sollte die postmortale Konzentration an A β nach einer intrazerebralen Infektion beurteilt werden. Dabei sollten vor allem folgende Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflusst eine intrazerebrale Infektion mit *E. coli* den Verlauf der AD im Mausmodell?
2. Hat eine intrazerebrale Infektion mit *E. coli* Einfluss auf die Amyloid- β -Konzentration in den Gehirnen der transgenen Tg2576-Mäuse?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

- Pipetten Eppendorf, Hamburg
- Schüttelplatte, Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
- Zentrifuge 5417R Eppendorf, Hamburg
- Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301 Eppendorf, Hamburg
- Vortexer IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
- Thermocycler T3 Biometra, Göttingen
- Sharp Mikrowelle R-216 Sharp Electronics GmbH, Hamburg
- DNA-Gelelektrophorese-Apparatur Bio-Rad, Hercules, USA
- UV-Kontaktlampe Vetter GmbH, Wiesloch
- Waage (Sartorius excellence E1200S) Sartorius AG, Göttingen
- Hochseil-Konstruktion Eigene Konstruktion
- Rotarod-System Neuroscience Inc, Tokyo, Japan
- Water-Maze-System TSE-Systems, Bad Homburg
- Infrarot-Lampe HP1511 Philips, Hamburg
- Brutschrank/Inkubator INB 200 Memmert, Schwabach
- Präparationsbesteck Aesculap, Tuttlingen
- Einbettautomat Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
- Eingießstation Shandon, Frankfurt
- Mikrotom Leica, Wetzlar
- Mikroskop BX51F Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
- Sonifikator UW 2070 Bandelin electronic, Berlin
- Multiplate Reader Tecan, Crailsheim

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien

- Natriumchlorid (NaCl) Merck, Darmstadt
- Trisaminomethan (Tris) Merck, Darmstadt
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Merck, Darmstadt
- Natriumdodecylsulfat (SDS) Merck, Darmstadt
- Proteinase K (recombinantPCR grade) Roche Applied Science, Mannheim
- Isopropanol (2-Propanol) Merck, Darmstadt

- Ethanol	Merck, Darmstadt
- PCR-Primer	MWG Biotech, Ebersberg
- Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
- PCR-Puffer Green GoTaq®	Promega Corporation, Madison, WI, USA
- dNTPS Set (molecular biology grade)	Fermentas Life Sciences, Vilnius, Litauen
- GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
- 100 bp DNA Ladder (GeneRuler®)	Fermentas Life Science, Vilnius, Litauen
- TBE-Puffer	Merck, Darmstadt
- Agarose (Electrophoresis grade)	Invitrogen life technologies, Berlin
- Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- O'Range Ruler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas Life Sciences, Vilnius, Litauen
- Ketaminhydrochlorid (Ketamin 100®)	Pharmanovo GmbH, Hannover
- Xylazin (Xylarium®)	Alvetra, Neumünster
- Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Delta Select, Pfullingen
- Ceftriaxon (Rocephin®)	Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen
- Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin
- Xylol	Merck, Darmstadt
- Hämalaunlösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
- Eisessig	Merck, Darmstadt
- Kaliumpermanganat (KMnO ₄)	Merck, Darmstadt
- Kaliumdisulfit (K ₂ S ₂ O ₅)	Merck, Darmstadt
- Oxalsäure	Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
- Essigsäure	Merck, Darmstadt
- Thioflavin S T1892-25G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Fluoromount	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
- ELISA Aβ1-40 und 1-42 Reagenzien	The Genetics company, Schlieren, Schweiz

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- E-Cups (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
- 10-ml-, 50-ml-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
- Spritzen (1ml, 2ml, 5ml, 10ml)	Braun, Melsungen

- Einmalkanülen (Sterican® 26G x ½) Braun, Melsungen
- Blutagarplatten Mikrobiologie Göttingen
- Einbettkassetten KABE Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
- ELISA Aβ 1-40,1-42 Test Platten The Genetics company, Schlieren, Schweiz

2.1.4 Software

- Videomot 2.0 TSE-Systems, Bad Homburg
- Cell^F Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg
- Definiens Definiens AG, München
- GraphPad Prism 5.0 GraphPad Software, San Diego, CA, USA

2.2 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Versuche wurden Mäuse verwendet, die gentechnisch verändert waren. Sie gehörten dem Stamm Tg2576 an, der 1995 von Dr. Karen K. Hsiao entwickelt wurde (Hsiao et al. 1995). Die Mutation, die der Mauslinie zugrunde liegt, wurde initial in einer schwedischen Familie beobachtet, in der eine familiär auftretende früh beginnende AD bekannt war. In dieser Familie gelang die Identifizierung der Doppelmutation $\text{Lys}^{670} \rightarrow \text{Asn}$, $\text{Met}^{671} \rightarrow \text{Leu}$ (K670N, M671L) in der Sequenz des humanen APP₆₉₅. Bei den Tg2576-Mäusen wurde diese Sequenz in das Genom der Mäuse eingesetzt und unter die Kontrolle des Hamster-Prion-Protein-Gens gestellt (Hsiao et al. 1996). Durch die Kontrolle mittels Prion-Promotor kommt es in den Neuronen zu einer Überexpression des mutierten APPs (King und Arendash 2002). Ab dem Alter von 9 bis 10 Monaten kommt es zu Gedächtnisdefiziten und ab dem Alter von 11 bis 13 Monaten auch zur Entwicklung von β -Amyloid-Plaques (Hsiao et al. 1996). Die Verpaarung sowie die Haltung der Versuchstiere und die Durchführung der Versuche erfolgten in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen. Prof. Dr. med. R. Schliebs aus dem Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung der Universität Leipzig stellte freundlicherweise den ursprünglichen Tg2576-Stamm bereit. Die Verpaarung erfolgte durch eine Rückkreuzung der C57B6/SJL-Tiere mit C57B6-Weibchen. Für die Versuche wurden sowohl Tiere verwendet, die das gentechnisch veränderte Gen nicht besaßen (nicht-transgen, Tg^{-/-}), als auch Mäuse, die heterozygot für das Gen waren (transgen, Tg^{+/-}). Eine Homozygotie wurde von den Mäusen nicht überlebt.

Insgesamt 92 Mäuse im Alter von 10 bis 15 Monaten wurden für die Versuche verwendet. Unter diesen Tieren waren 44 transgene (Tg^{+/-}) und 48 nicht-transgene Mäuse (Tg^{-/-}). Das mittlere Alter der Mäuse in den beiden Gruppen lag bei etwa 13 Monaten.

Den Versuchstieren wurde Nahrung und Wasser nach Belieben bereit gestellt. Die Haltung erfolgte in offenen Einzel- oder Gemeinschafts-Käfigen zu maximal fünf Mäusen. Aufgrund des stark aggressiven Verhaltens der Männchen untereinander wurden diese ausschließlich in Einzelkäfigen gehalten. Die Weibchen wurden zu Beginn der Versuchsreihe ebenfalls getrennt. Die Versuche wurden nicht geschlechtergetrennt durchgeführt, da aufgrund der langen Haltungsdauer nicht genügend Mäuse eines Geschlechts zur Verfügung standen. Das Geschlechterverhältnis lag in der transgenen Gruppe bei ca. 2 : 3 (männlich : weiblich) und in der nicht-transgenen Gruppe bei 1 : 1. Die Versuche fanden in derselben Räumlichkeit statt, in der die Tiere gehalten wurden, um eine mögliche Irritation durch einen Raumwechsel und die damit verbundene mögliche Beeinflussung der Leistungsfähigkeit der Mäuse in den Tests zu verhindern. Der Raum wies eine Raumtemperatur von 20°C sowie eine relative Luftfeuchtigkeit von ca. 55% auf. Bei der Beleuchtung wurde auf einen Tag-Nacht-Rhythmus geachtet. Die Photoperiode umfasste jeweils zwölf Stunden Helligkeit sowie zwölf Stunden Dunkelheit, wobei die Versuche stets in der hellen Phase durchgeführt wurden. Die Tiere wurden täglich von den Mitarbeitern der ZTE betreut. In der Versuchszeit wurden die Mäuse des Weiteren von der durchführenden Versuchsleiterin dreimal in der Woche und während den Tagen der Infektion täglich gewogen. Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurden Tiere, die durch die Infektion einen zu starken Gewichtsverlust erlitten, durch zervikale Dislokation getötet.

Für das Auseinanderhalten der Mäuse wurden Ohrmarken verwendet. Des Weiteren wurde zur Identifizierung der Tg^{+/-}- und Tg^{-/-}-Mäuse ein Stück des Schwanzes entfernt. Die Erkennung erfolgte mit Hilfe einer Genotypisierung, in der das Gen für das humane Amyloid-Vorläuferprotein hAPP₆₉₅ nachgewiesen wurde (siehe auch Kapitel 2.3).

Die folgenden Experimente wurden von der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen befürwortet und von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt. Die Versuche wurden zwischen September 2008 und Dezember 2011 in den Laboren der Abteilung Neuropathologie an der Universität Göttingen durchgeführt.

2.3 Genotypisierung der Tg2576-Mäuse

Für die Versuche wurden sowohl Tg^{+/-}- als auch Tg^{-/-}-Mäuse des Stammes Tg2576 verwendet, um eine mögliche Kausalität zwischen Transgenität, Inflammation und Verschlechterung der motorischen sowie neuropsychologischen Fähigkeiten nachzuweisen. Um die Transgenität der phänotypisch unauffälligen Mäuse identifizieren zu können, wurde vor dem Beginn des Versuches eine Genotypisierung durchgeführt.

2.3.1 DNA-Extraktion

Procedere:

Für die Genotypisierung der Tg2576-Mäuse wurden 0,8 cm lange Schwanzspitzen verwendet. Diese Schwanzspitzen wurden den Mäusen im Alter von drei Lebenswochen entfernt und in einem 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (E-Cup) für die Extraktion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bereitgestellt.

Für die DNA-Extraktion wurde ein spezieller Puffer angesetzt (Tail-Lysis-Puffer), der zusammen mit einer Proteinase K die DNA aus den Mausschwänzen extrahierte. Dieser Puffer wurde aus folgenden Substanzen zusammengesetzt: 100 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 200 mM Natriumchlorid (NaCl) sowie 1%iges Natriumlaurylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate; SDS). Für die DNA-Extraktion wurde die Proteinase K in dem Tail-Lysis-Puffer gelöst, sodass die Proteinase K eine Endkonzentration von 100 µg/ml aufwies.

Von der Lösung wurden je 350 µl zu den Gewebeproben pipettiert. Dieses Gemisch wurde anschließend über Nacht bei 56°C auf einer Schüttelplatte (Thermomixer) belassen. Dies diente zur Verdauung des Gewebes durch die Proteinase K, wodurch es zum Lösen der DNA aus den Zellen kam.

Nach der Verdauung wurden die Proben in einer Zentrifuge bei 20800 x g fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Überführung des Überstandes in ein neues E-Cup. Der Überstand wurde sodann mit 350 µl Isopropanol vermischt. Diese Substanz sorgt für das Ausfällen der DNA. Das Gemisch wurde erneut bei 20800 x g für zehn Minuten bei +4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation setzte sich die DNA am Boden des E-Cups ab, und der Überstand konnte ohne Verlust der DNA verworfen werden. Das Pellet wurde danach bei Raumtemperatur getrocknet.

Das getrocknete Pellet wurde daraufhin mit 350 µl 70%igem Ethanol gewaschen und noch einmal bei 20800 x g über fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, und das Pellet wurde bei Raumtemperatur zum Trocknen stehen gelassen. Oft war eine zweite Zentrifugation hilfreich, um die Trockenzeit zu verkürzen. Ebenfalls als hilfreich stellte sich die Benutzung einer Vakuum-Zentrifuge heraus, die die restliche Flüssigkeit in dem Behältnis vollständig eliminierte, was für die Lösung der DNA in Wasser von Nöten war. Zum Schluss wurde die DNA in 50 µl doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidest.) gelöst und konnte bei -20°C aufbewahrt werden.

2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Allgemeines:

Die DNA-Menge, die durch die DNA-Extraktion gewonnen werden kann, reicht für eine qualitative Bestimmung bestimmter DNA-Abschnitte mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese oft nicht aus. Deswegen wird der eigentlichen makroskopischen DNA-Darstellung das Verfahren der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vorgeschaltet. Dieses Verfahren dient dazu, DNA in vitro zu amplifizieren. Dabei werden von der ursprünglichen DNA durch eine DNA-Polymerase Kopien angefertigt. Aus diesen Kopien werden in weiteren Zyklen immer wieder neue Kopien hergestellt. Es liegt eine Kettenreaktion vor. Bei der DNA-Polymerase wird vorwiegend die sogenannte Taq-Polymerase verwendet. Dieses Enzym stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Der Grund für die einheitliche Verwendung liegt in dem Temperaturbereich der PCR. Für die Trennung der DNA-Stränge wird eine hohe Temperatur von ca. 95°C benötigt. Bei dieser Temperatur denaturieren die meisten Enzyme. Die Taq-Polymerase hingegen ist hitzestabil und kann somit die Erhitzung während einer PCR unbeschadet überstehen (Saiki et al. 1988).

Durch den Einsatz spezifischer Primer können bestimmte Sequenzen des Genoms ausgewählt werden, die amplifiziert werden sollen. Dadurch können unterschiedliche DNA-Sequenzlängen entstehen, die dann bei der nachfolgenden Gel-Elektrophorese unterschiedliche Banden erzeugen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tg2576-Mäuse genotypisiert. Dafür wurden drei verschiedene Primer verwendet (5' → 3'):

1. Primer 1501: AAG CGG CCA AAG CCT GGA GGG TGG AAC CA
2. Primer 1502: GTG GAT AAC CCC TCC CCC AGC CTA GAC CA
3. Primer 1503: CTG ACC ACT CGA CCA GGT TCT GGG T.

Procedere:

Zunächst wurde der Master Mix angesetzt. Pro DNA-Probe wurden dafür 6,21 µl Aqua bidest., 0,69 µl Dimethylsulfoxid (DMSO), 2,5 µl Puffer-Lösung sowie jeweils 0,5 µl der drei Primer und 0,5 µl der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) verwendet. Zu dem Mastermix wurden anschließend 0,1 µl Taq-Polymerase und 2 µl von der in 50µl Aqua bidest. gelösten DNA hinzugefügt. Um die Taq-Polymerase nicht zu beschädigen, wurde stets zügig pipettiert und bei längeren Wartezeiten die Lösung auf Eis gestellt.

Zusätzlich zu den DNA-Proben der zu untersuchenden Versuchstiere wurde eine Negativprobe (Tg^{-/-}) sowie eine Positivprobe (Tg^{+/-}) verwendet, um die Funktionsfähigkeit der

PCR sicherzustellen, falls alle Proben negativ sein sollten. Außerdem wurde Aqua bidest. als Nullprobe verwendet, um mögliche Verunreinigungen auszuschließen.

Die Amplifizierung der DNA erfolgte in einem Thermocycler. Dieser wurde wie folgt programmiert: Drei Minuten bei 95°C (Aufspaltung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge); danach folgte ein Zyklus, der 35 mal wiederholt wurde: 40 Sekunden bei 95°C gefolgt von 30 Sekunden bei 54°C (Anlagerung der Primer) und anschließend eine Minute bei 72°C (Amplifizierung der DNA durch die Taq-Polymerase). Zum Schluss wurden die Proben ein weiteres Mal auf 72°C für zehn Minuten erhitzt, um noch unvollständige Stränge zu komplettieren.

2.3.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Allgemeines:

Die Agarose-Gel-Elektrophorese dient dazu, unterschiedlich lange DNA-Fragmente mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufzutrennen. Sie ist eine der effizientesten Methoden, DNA-Abschnitte nach ihrer Größe und der Ladung zu separieren (Dretzen et al. 1981). Durch die negative Ladung der DNA (Phosphat) wandert die DNA im elektrischen Feld von Minuspol zum Pluspol. Kleine DNA-Fragmente wandern schneller als große Fragmente, da sie nicht so stark von dem Gel aufgehalten werden. Durch den Vergleich der entstandenen Banden mit einem Basenpaar-Marker kann die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

Procedere:

Die amplifizierten DNA-Sequenzen konnten anschließend mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden. Für die Herstellung eines Gels aus Agarose, welches Platz für 18 bis 20 Proben enthielt, wurden 2 g Agarose mit 75 ml 1xTBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer) vermengt, was einem 2,67%igen Gel entsprach. Das 1xTBE wurde aus 10xTBE verdünnt, welches aus folgenden Substanzen bestand: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA auf 1 Liter Aqua bidest.

Die Suspension aus 1xTBE und Agarose wurde daraufhin in einem Erlenmeyer-Kolben in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Zu der Lösung wurde 2,5µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Dieser Stoff diente zum Nachweis der DNA, da er mit Nukleinsäuren interkaliert und dabei das eigene Absorptionsspektrum verändert, was unter UV-Licht dargestellt werden konnte. Aufgrund der Toxizität sowie Gesundheitsschädlichkeit des Ethidiumbromids wurde bei der Benut-

zung des Stoffes auf das Tragen spezieller Handschuhe aus Nitril geachtet. Auch das Gel wurde später in einem gesonderten Abfall entfernt.

Das flüssige Gel wurde in eine Gel-Ausgießform eingegossen, in der sich außerdem ein Kamm befand, der die Taschen für die spätere Auftragung der Proben freihielt. Das Gel wurde anschließend für 30 min zum Aushärten im dunklen Raum stehen gelassen. Nach Entfernung des Kammes wurde das Gel in eine Elektrophorese-Kammer gesetzt und mit 1xTBE begossen bis es vollständig bedeckt war.

Auftragen der Proben:

Je 10 µl der Proben wurden auf die Taschen des Gels verteilt, dabei war es von Vorteil, wenn sich in jeder Reihe 2 µl eines Basenpaar-Markers (100 bpM) sowie 10 µl einer Positiv-Probe (eine sicher positive Tg^{+/-}-Maus) und 10 µl einer Negativ-Probe (eine sicher negative Tg^{-/-}-Maus) sowie 10 µl der Aqua bidest. (Null-) Probe befanden (siehe Abb. 1).

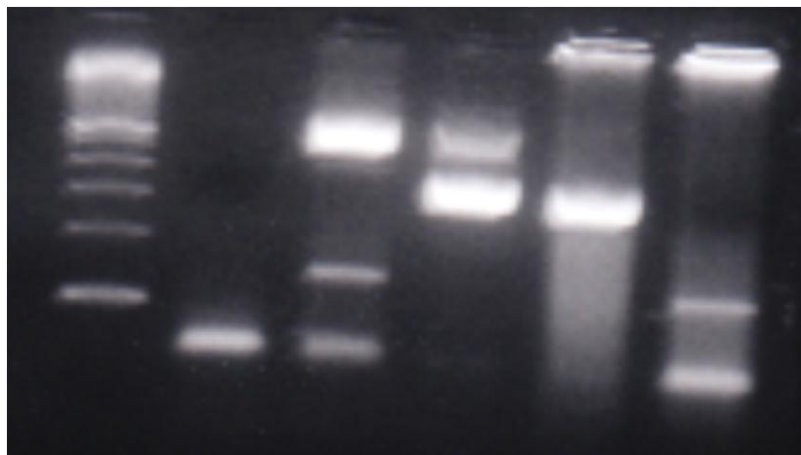


Abb. 1: Gelelektrophorese-Beispiel. Zu sehen sind von links nach rechts: 100 bpM, Aqua bidest., Negativ-Kontrolle, Positiv-Kontrolle; Tg^{+/-}-Maus; Tg^{-/-}-Maus

Die Elektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 120 Volt für 45 Minuten. Anschließend wurde das Gel auf eine UV-Kontaktlampe gelegt, wodurch das Ethidiumbromid fluoreszierte und somit die DNA sichtbar wurde.

Die Banden wurden wie folgt gelesen:

Tg^{-/-}-Maus: 703 bp-Bande (oberste Bande)

Tg^{+/-}-Maus: 703 bp + 430 bp-Bande

2.4 Versuchsablauf

Mit Hilfe motorischer und neuropsychologischer Tests sollten die Auswirkungen einer intrazerebralen Infektion mit *E. coli* auf die Mäuse untersucht werden. Dabei wurden drei verschiedene Tests durchgeführt, die mit einem festgelegten Versuchsaufbau verbunden waren. Das neuropsychologische Testverfahren war der Morris-Water-Maze-Test. Zu den motorischen Tests gehörten der Rotarod- sowie der Seil-Test.

Der Versuch begann mit drei Testtagen (-3, -2, -1), an denen die Mäuse lernen sollten, wie sie die Versuche durchzuführen hatten. Bei dem Morris Water Maze sollten die Tiere die Lokalisation einer unsichtbaren Plattform erlernen. Bei dem Rotarod- und dem Seil-Test wurden die motorischen Fertigkeiten der Mäuse trainiert. Darauf folgte am Tag 0 die intrazerebrale Injektion des Bakteriums *E. coli*. Dafür wurden die Mäuse in Kontroll- und Versuchsgruppen aufgeteilt, wobei die Kontrollgruppe 0,9%ige NaCl-Lösung intrazerebral verabreicht bekam.

Nach ca. 41 Stunden wurde mit der Antibiose begonnen, die über fünf Tage alle 12 h durchgeführt wurde. Es folgten vier Wochen mit je einem Seil-Test, einem Rotarod-Test und einem Water-Maze-Versuch pro Woche. Zusätzlich wurden die Mäuse dreimal pro Woche gewogen. In der akuten Zeit der Infektion (Tag 1 bis 7) wurden die Mäuse zusätzlich täglich einmal gewogen und bei einem Gewichtsverlust von über 15% des Ausgangsgewichtes aus tierschutzrechtlichen Gründen getötet (siehe auch Kapitel 2.7.1, S. 31).

In der letzten Woche des Versuches (Tag 29 - 31) wurde der Water-Maze-Versuch noch einmal mit versetzter Plattform durchgeführt. Die Tötung der Mäuse erfolgte am letzten Tag des Versuches (Tag 31; siehe Abb. 2).

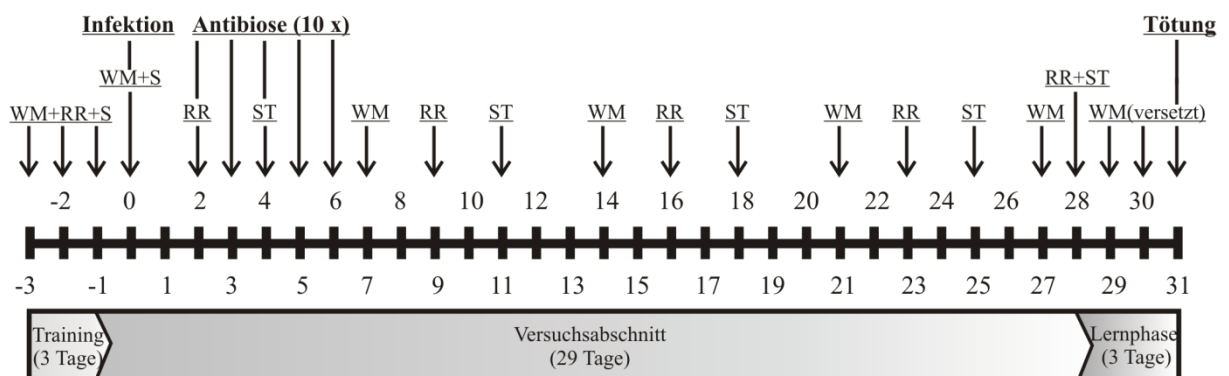


Abb. 2: Versuchsablauf. WM = Morris Water Maze, RR = Rotarod-Test, ST = Seil-Test. Zusätzlich wurde an jedem Versuchstag das Gewicht der Mäuse bestimmt

2.5 Neuropsychologische und motorische Versuche

2.5.1 Morris Water Maze

Allgemeines:

Der Morris Water Maze stellt eine experimentelle Methode dar, um die kognitiven Fähigkeiten wie die räumliche Orientierungsfähigkeit sowie das Lernverhalten von Nagetieren zu beurteilen. Der Water-Maze-Test wurde initial entwickelt, um das räumliche Lernen bei Ratten zu untersuchen (Morris 1984). Bei diesem Verfahren werden die Versuchstiere in ein rundes Wasserbecken gesetzt. Ziel ist es, dass die Mäuse durch das Auffinden und Betreten einer unsichtbaren Plattform das Wasser verlassen. Dabei können sich die Mäuse nur an äußeren Stimuli orientieren, dementsprechend muss die Lokalisation der Plattform in einem Training erlernt werden. Als äußere Stimuli dienten in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verschiedene Poster und Markierungen, die an den Wänden des Versuchsraumes angebracht waren. Diese wurden während des gesamten Versuches nicht verschoben. Gegenüber anderen Verhaltensexperimenten hat das Water-Maze-Experiment den Vorteil, dass keine Belohnungsstrategien im Sinne von Futter oder Bestrafungen wie elektrische Reize gesetzt werden müssen, um die Mäuse zum Ausführen des Experimentes zu zwingen. Die Mäuse wollen instinktiv das Wasser verlassen (Morris 1984).

Procedere:

Das weiße Wasserbecken hatte einen Durchmesser von 104 cm und eine Tiefe von 35 cm. In diese Wanne wurde etwa bis zur Hälfte der Höhe Wasser eingelassen, dabei wurde stets auf eine Temperatur zwischen 22 und 24°C geachtet. Das Becken wurde in vier Quadranten eingeteilt. Die durchsichtige runde Plattform (Durchmesser 9 cm) wurde in der Mitte des oberen linken Quadranten platziert. Sie befand sich etwa 1 cm unterhalb der Wasseroberfläche, sodass sie von den Mäusen visuell nicht erfasst werden konnte. Sie behielt in den ersten vier Wochen immer die gleiche Position. Die Mäuse wurden stets an der gleichen Stelle in das Wasser gelassen. Um die Mäuse nicht zu beeinflussen, war der Versuchsleiter während der Versuche hinter einem Paravent versteckt.

Die Aufnahme, Speicherung sowie Auswertung der Schwimmversuche erfolgte mit Hilfe des Systems „VideoMot2 Video Tracking System“ der Firma TSE-Systems GmbH (Bad Homburg). Das System bestand aus einer Kamera, die sich in einer Höhe von 2 m über der Mitte des Beckens befand. Diese Kamera war an einen Computer angeschlossen, der über das Programm VideoMot 2.0 Zeit, Geschwindigkeit und Strecke der Schwimmversuche

detektierte. Das Programm stoppte nach 90 Sekunden automatisch, somit hatten die Mäuse maximal 90 Sekunden Zeit, um die Plattform aufzufinden. Bei Erreichen der Plattform stoppte das Programm ebenfalls. Jene Mäuse, die die Plattform auch nach 90 Sekunden noch nicht erreicht hatten, wurden für weitere 30 Sekunden auf die Plattform gesetzt. Sie erhielten die Zeit von 91 Sekunden in der Auswertung.

Es wurde mit einem dreitägigen Training begonnen, bei dem jede Maus pro Tag sechsmal die Chance bekam, die durchsichtige Plattform zu finden (Tag -3 bis -1, siehe Abb 2). Um eine Erschöpfung zu vermeiden, wurden die Mäuse zwischen zwei Schwimmversuchen für mindestens eine halbe Stunde außerhalb des Wassers belassen. Des Weiteren wurden die Mäuse unter eine Rotlichtlampe gesetzt, um einer Unterkühlung entgegenzuwirken.

Nach der Trainingsphase wurde die Anzahl der Wiederholungen pro Tag auf drei herabgesetzt. Des Weiteren wurde der Abstand zwischen den einzelnen Water-Maze-Experimenten auf eine Woche erweitert. Diese Serien von je drei Versuchen wurden an fünf Versuchstagen durchgeführt. Die erste Serie fand noch vor der Infektion mit *E. coli*, am Tag 0 des Versuches statt. Dieser Schwimmversuch wurde für die Gruppeneinteilung der Mäuse verwendet. Die eine Gruppe sollte später mit dem Bakterium infiziert werden. Der anderen Gruppe wurde NaCl 0,9% intrazerebral injiziert (siehe Kapitel 2.6.2, S. 27). Die anderen vier Läufe fanden an den Tagen 7, 14, 21 und 27 statt (siehe Abb. 2) und sollten zur Untersuchung der Gedächtnisleistung dienen.

In den letzten 3 Tagen (Tag 29 bis 31, siehe Abb. 2) des Versuches wurde die Plattform in einen anderen Quadranten des Beckens versetzt. Hier wurden die Bedingungen der Trainingsphase erneut aufgegriffen, dementsprechend fanden an drei aufeinanderfolgenden Tagen pro Tag sechs Durchläufe statt. Dieser Versuch diente zur Untersuchung der Lernfähigkeit der Versuchstiere nach stattgefundener und ausgeheilter Infektion.

Auswertung:

Manchen Mäusen gelang es nicht innerhalb von 90 Sekunden die Plattform zu erreichen. Außerdem gab es große intraindividuelle Schwankungen. Dementsprechend wurden für die Analyse der nicht-parametrischen Daten aus dem Water-Maze-Experiment die Mediane der Schwimmversuche pro Tag und Maus verwendet. Bei der Analyse wurden sowohl die Tg^{+/-} den Tg^{-/-}-Mäusen gegenüber gestellt als auch die infizierten den nicht-infizierten Mäusen.

2.5.2 Rotarod-Test

Das Rotarod ist ein spezielles Laufrad, mit dessen Hilfe die motorischen Leistungen, insbesondere die Koordination sowie die Gleichgewichtsfunktion der Mäuse erfasst werden können. Auf diesem Laufrad können zeitgleich bis zu fünf Mäusen nebeneinander laufen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Rotarod-System der Firma Neuroscience (Tokyo, Japan) bestand aus einer rotierenden rutschsicheren Stange mit einem Durchmesser von etwa 3 cm, auf die die Mäuse gesetzt wurden. Diese Stange befand sich in einer Höhe von ca. 15 cm. Die Geschwindigkeit der Rotation wurde von 4 rpm auf 40 rpm langsam während des Laufes gesteigert. Gemessen wurde die Latenz, bis die Mäuse von der Stange herunterfielen. Die maximal erreichbare Zeit wurde auf 300 Sekunden begrenzt. Während der Trainingsphase in den ersten drei Tagen des Versuches wurde jede Maus einmal pro Tag auf das Laufrad gesetzt. In den folgenden Wochen nach der Infektion wurde der Rotarod-Test einmal wöchentlich durchgeführt (an den Tagen 2, 9, 16, 23 und 28; siehe auch Abb. 2). Für die Auswertung wurden die Zeiten, die die Mäuse auf der Stange verbracht hatten, verwendet.

2.5.3 Seil-Test

Allgemeines:

Der Seil-Test ist ähnlich zu dem oben genannten Rotarod-Test ein Experiment, mit dessen Hilfe die motorischen Fähigkeiten von Mäusen beurteilt werden können. Der Test wurde in der Trainingsphase einmal täglich durchgeführt. Anschließend wurde er an den Tagen 1, 4, 11, 18, 25 und 28 des Versuches wiederholt (siehe Abb. 2).

Procedere:

Die Seil-Test-Konstruktion bestand aus einem 60 cm langen Seil, das 60 cm über dem Boden befestigt war. Dieses 1 mm dicke Seil war straff gespannt, sodass es dem Gewicht der Maus nicht nachgeben konnte. Durch die Befestigung des Seils an dessen Enden wurde ein Schwingen des Seils weitestgehend verhindert. An den Enden waren außerdem zwei Plattformen angebracht. Die Mäuse wurden mit den Vorderpfoten in die Mitte des Seiles gehängt. Um das Verletzungsrisiko zu minimieren, wurde der Boden unter dem Seil gepolstert. Die Aufgabe bestand darin, eine der beiden Plattformen zu erreichen, dafür wurde eine Zeit von maximal 60 Sekunden vorgegeben.

Je nach Zeit, die eine Maus benötigte, um eine der beiden Plattformen zu erreichen, wurde eine Punktzahl (siehe Tabelle 1) vergeben (Wellmer et al. 2000).

Erreichen einer der Plattformen in < 60 s		Fall auf den Boden in < 60 s	
Zeit bis zum Erreichen [s]	Punktzahl	Zeit bis zum Absturz [s]	Punktzahl
≤ 6	0	59 bis 54	11
7 bis 12	1	53 bis 48	12
13 bis 18	2	47 bis 42	13
19 bis 24	3	41 bis 36	14
25 bis 30	4	35 bis 30	15
31 bis 36	5	29 bis 24	16
37 bis 42	6	23 bis 18	17
43 bis 48	7	17 bis 12	18
49 bis 54	8	11 bis 6	19
55 bis 60	9	≤ 5	20
Nicht-Erreichen der Plattform innerhalb 60 s, aber Verweilen am Seil ≥ 60 s			
Zeit > 60 s		Punktzahl 10	

Tab. 1: Seil-Test Bewertung: Punktzahl nach Zeit.

2.6 Intrazerebrale Infektion mit dem Bakterium *Escherichia coli*

2.6.1 Herstellung des Inokulums

Zur Induktion der Meningitis wurde ein Bakterienstamm *E. coli* K1 verwendet. Der Originalstamm wurde von einem Meningitis-Patienten isoliert (Geschenk von Gregor Zysk, Abteilung medizinische Mikrobiologie, Universität Düsseldorf). Für den Versuch wurde zuvor ein neues Inokulum erzeugt, um eine möglichst hohe Virulenz des Bakteriums zu erreichen. Dazu wurde ein älteres Inokulum, welches bei -70°C aufbewahrt wurde, einer nicht-transgenen Maus mit einer Konzentration von 10¹⁰ CFU/ml intrazerebral injiziert. Aufgrund der hohen Bakterienlast verstarb die Maus am folgenden Tag und ein Gehirn-Homogenat wurde erstellt. Dieses Homogenat wurde auf Agar-Platten für 24 h bei 37°C kultiviert (siehe Kapitel 2.6.3, S. 29). Die am nächsten Tag sichtbaren Bakterien-Kolonien wurden von der Agarplatte mit 0,9%iger NaCl-Lösung vorsichtig abgeschabt und für die anschließende Injektion bei -70°C aufbewahrt.

2.6.2 Die Injektion

Die Infektion erfolgte am Tag 0 des Versuches (siehe Abb. 2). Zunächst wurden die Tiere mit Hilfe einer intraperitonealen Anästhesie sediert. Die Anästhesie bestand aus Ketamin in einer Konzentration von 66 mg/ml und Xylazin in einer Konzentration von 6,6 mg/ml.

Jeder Maus wurden gewichtsadaptiert 1,5 $\mu\text{l/g}$ Mausgewicht von dieser Lösung in das untere Bauchdrittel injiziert. Die Anästhesie erfolgte dementsprechend in einer Konzentration von ca. 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin und ca. 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin. Für die Injektion wurde die Maus in leichter Rückenlage in einer Hand fixiert und die Kanüle (27 Gauge) tangential von unten herangeführt und circa 0,5 mm unter die Bauchdecke geführt. Die intrazerebrale Injektion erfolgte sobald die Maus sich nicht mehr bewegte und auf äußere Reize nicht mehr reagierte.

Für die intrazerebrale Injektion wurde für die Experimentiergruppe *E. coli* des Stammes K1 verwendet. Die Konzentration des Bakteriums betrug $3,1 \times 10^{10}$ CFU/ml und wurde für den Versuch 1 : 52.000 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt. Dies entsprach einer Zielkonzentration von ca. 6×10^5 CFU/ml. Jeder Maus wurden 10 μl des Bakteriums intrazerebral injiziert. Dabei erfolgte die Injektion rechts frontal im Abstand von 0,5 cm zum rechten Auge direkt unter die Knochenplatte in den Subarachnoidalraum. Mit Hilfe eines Aufsatzes gelang es die Einstichtiefe zu kontrollieren, um nicht mit der Kanüle zu tief in das Gehirn vorzudringen. Jeder Maus wurden 6×10^3 CFU (Colony forming units; Koloniebildende Einheiten) verabreicht. Der Kontrollgruppe wurden 10 μl einer 0,9%igen NaCl-Lösung mit der gleichen Methode injiziert.

Die Injektion erfolgte bei insgesamt 88 Mäusen. Vier der 92 Mäuse, die für die Versuche eingeplant waren, starben bei der Anästhesie und vor der intrazerebralen Injektion. Insgesamt wurden 23 transgene ($\text{Tg}^{+/-}$) Mäuse mit dem Bakterium *E. coli* infiziert und 20 nicht-transgene ($\text{Tg}^{-/-}$) Mäuse. Eine Maus starb direkt nach der Injektion durch eine Gehirnblutung. Des Weiteren wurden 14 transgenen ($\text{Tg}^{+/-}$) und 17 nicht-transgenen ($\text{Tg}^{-/-}$) Mäusen 0,9%ige NaCl-Lösung intrazerebral appliziert.

Zusätzlich wurden 12 weitere Mäuse infiziert, die später nicht mit dem Antibiotikum behandelt werden sollten, um die Virulenz des Bakteriums erneut nachzuweisen. Unter diesen 12 Mäusen waren zwei $\text{Tg}^{+/-}$ -Mäuse und zehn $\text{Tg}^{-/-}$ -Mäuse. Des Weiteren wurden einer $\text{Tg}^{-/-}$ - und einer $\text{Tg}^{+/-}$ -Maus 0,9%ige NaCl-Lösung injiziert um eine mögliche Verunreinigung der NaCl-Lösung, die für die Verdünnung des Antibiotikums benutzt wurde, auszuschließen. Bei der Gruppeneinteilung wurde darauf geachtet, dass ein annähernd gleiches Geschlechterverhältnis zwischen den $\text{Tg}^{+/-}$ - und den $\text{Tg}^{-/-}$ -Mäusen entstand.

Im Anschluss an die intrazerebrale Injektion erfolgte eine Überprüfung der Bakterienkonzentration im Inokulum anhand einer Verdünnungsreihe (siehe folgendes Kapitel). Die Analyse der Agarplatte ergab eine Konzentration des Bakteriums von 6×10^5 CFU/ml.

2.6.3 Verdünnungsreihen und Ausplattieren auf Agarplatten

Allgemeines:

Verdünnungsreihen werden zur Bestimmung von Bakterienkonzentrationen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden sie an drei Stellen angewendet:

1. Ausplattieren des Inokulums, um die genaue Konzentration zu erfahren
2. Ausplattieren des in NaCl 0,9% homogenisierten Cerebellums (siehe Kapitel 2.7.1, S. 31)
3. Ausplattieren der in NaCl 0,9% homogenisierten Milz (siehe Kapitel 2.7.2, S. 31).

Procedere:

Im Anschluss an die Injektion wurde die Konzentration des *E. coli* im Inokulum überprüft, indem eine Verdünnungsreihe erstellt und auf einer Agarplatte ausplattiert wurde. 10 µl des 1 : 85.000 verdünnten Inokulums wurden auf eine Agarplatte gegeben, weitere 10 µl wurden in ein E-Cup mit 90 µl 0,9%iger NaCl-Lösung gegeben und ebenfalls auf eine Agarplatte ausplattiert. Dies entsprach einer Verdünnung von 1 : 10. Aus dieser Lösung wurden wiederum 10 µl in ein neues E-Cup mit 90 µl 0,9%iger NaCl-Lösung gegeben, was einer Verdünnung von 1 : 100 entsprach, dieses wurde erneut ausplattiert. Dieses Schema (siehe Abb. 3) wurde weiter durchgeführt bis zu einer Verdünnung von 1 : 100.000. Danach wurden die Agarplatten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

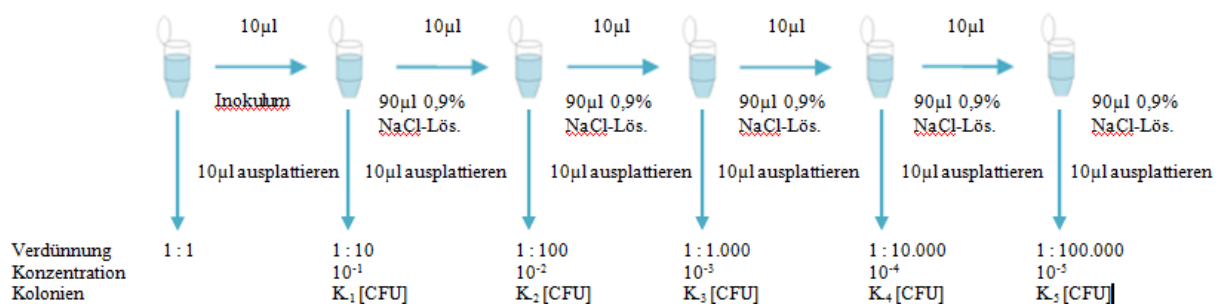


Abb. 3: Verdünnungsreihen.

Auswertung der Agarplatten:

Zunächst wurde die Anzahl der Kolonien, die bei einer bestimmten Verdünnungsstufe gewachsen waren, gezählt und dokumentiert. Danach wurde die Konzentration des Inokulums unter Berücksichtigung der Koloniezahl, der Verdünnung und des ausplattierten Volumens berechnet.

2.6.4 Beurteilung der Infektionsstärke

In tierexperimentellen Versuchen können die typischen Symptome der Meningitis, wie Nackensteife, Kopfschmerz oder Fieber, schlecht beurteilt werden. Daher wurde zum einen auf einen Gewichtsverlust der Mäuse, zum anderen auf eine Lethargie als sehr sensitive Zeichen für das Vorhandensein einer Meningitis bei Mäusen geachtet (Nau et al. 1999b).

Um sicher zu gehen, dass die Infektion stark genug war, wurden außerdem mehrere Mäuse infiziert, die nicht mit Antibiotikum behandelt werden sollten. Ihr Tod sollte eine ausreichend starke Infektion beweisen. Um nach ihrem Tod nachzuweisen, dass die Tiere an der Meningitis verstarben und nicht an der Injektion, wurden die Bakterien-Konzentrationen in der linken Kleinhirnhemisphäre sowie in der Milz postmortal bestimmt.

2.6.5 Die Antibiose

Nach 41 Stunden wurde mit der ersten Antibiose begonnen. Die Antibiose wurde jeder Maus insgesamt zweimal pro Tag fünf Tage lang s.c. injiziert. Dabei wurde auf einen Abstand von 12 Stunden zwischen zwei Injektionen geachtet. Es wurde 1 g Ceftriaxon in 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst, sodass eine Konzentration von 100 mg/ml vorlag. Diese Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt. Vor der subkutanen Injektion des Antibiotikums wurde dieses zunächst aufgetaut und anschließend noch einmal weiter mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 10 mg/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurde jeder Maus ca. 10 µl/g Mausgewicht subkutan in die rechte Flanke appliziert. Auch hier war eine Fixierung wichtig, in diesem Fall wurde die Maus auf einer Unterlage mit einer Hand festgehalten. Die Kanüle wurde ca. 0,3 mm unter die Hautdecke geführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Antibiose direkt unter die Haut und nicht intramuskulär verabreicht wurde. Sowohl den infizierten Tieren als auch den nicht-infizierten NaCl-Mäusen wurde das Antibiotikum appliziert, um einen möglichen Effekt der Antibiose auszuschließen.

2.7 Gewebepräparation und Proteinextraktion

Allgemeines:

Die AD manifestiert sich nicht nur klinisch, sondern auch histopathologisch, zum Beispiel durch A β -Ablagerungen in Form neuritischer Plaques. Für die Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Dichte der A β -Plaques und den Leistungen in den Tests wurden die Proteine mithilfe eines ELISA-Puffers der Firma „the Genetics Company“ (Schlieren, Schweiz) aus den Gehirnen der Versuchstiere extrahiert. Des Weiteren erfolgte die Anfertigung von Gehirnschnitten und die Färbung mittels Thioflavin

für die anschließende Beurteilung unter dem Mikroskop. Außerdem wurde die Milz für spätere Analysen zur inflammatorischen Reaktion entnommen.

2.7.1 Gehirn-Präparation

Die Tötung der Mäuse erfolgte per Genickbruch am Versuchsende bzw. bei Auftreten eines Gewichtsverlustes von über 15% des Ausgangsgewichts als Folge der intrazerebralen Infektion mit *E. coli*.

Die Präparation begann zunächst mit der Trennung des Kopfes vom Körper. Anschließend wurde die Haut über dem Schädelknochen in der Medianlinie aufgetrennt und zur Seite geschoben. Mit Hilfe einer Pinzette konnten die Schädelknochen von medial nach lateral hin aufgebrochen werden. Nach Entfernung der Schädelknochen konnte das Gehirn von kaudal her inklusive der meningealen Strukturen herausgelöst werden. Dabei wurden die Sehnerven und die Bulbi olfactorii möglichst weit distal abgesetzt. Nach Durchtrennung der Strukturen konnte das Gehirn aus der Schädelbasis entnommen werden.

Die beiden Hemisphären wurden in der Medianlinie voneinander abgetrennt und jeweils die rechte Hemisphäre in 5 ml einer Lösung aus Formaldehyd und PBS (4%ige Formaldehyd-Lösung) bei 4°C aufbewahrt. Diese Hemisphäre diente zur späteren Untersuchung unter dem Mikroskop (siehe auch Kapitel 2.7.5, S. 33).

Von der linken Hemisphäre wurde das Cerebellum abgetrennt. Bei den Mäusen, die vor dem Versuchsende verstarben, wurde das Cerebellum, welches ein Gewicht von ca. 30 mg hatte, in 500 µl 0,9%iger NaCl-Lösung homogenisiert und im Vortex gut vermischt. Daraufhin wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. (siehe Kapitel 2.6.3, S. 29). So konnte nachgewiesen werden, dass die Mäuse mit *E. coli* infiziert waren und nicht aus einem anderen Grund vorzeitig verstorben sind. Bei den Mäusen, die bis zum Versuchsende überlebt hatten, wurde die linke Hemisphäre des Cerebellums für spätere Untersuchungen bei -20°C aufbewahrt.

Die linke Großhirn-Hemisphäre wurde halbiert und in zwei E-Cups (Frontalhirn in Cup A und Hinterhirn in Cup B) bei -20°C aufbewahrt. Das im Cup B befindliche Hinterhirn wurde später für die Amyloid-β-Messung verwendet (siehe Kapitel 2.7.6, S. 34).

2.7.2 Milz-Präparation

Des Weiteren wurde die Milz entfernt, um eine systemische Infektion zu bestätigen. Dazu wurde die ventrale Haut des Körpers mit einer Schere von kranial her in der Medianlinie bis zur Mitte des Abdomens aufgetrennt und zur Seite geschoben. Durch die anatomische

Lage der Milz im linken Oberbauch musste zunächst der Magen aus dem Situs herausgehoben werden, um anschließend die Milz frei präparieren zu können. Das Organ wurde von den Bändern abgetrennt und dem Situs entnommen. Nach Halbierung der Milz wurde ein Teil der Milz bei -20°C eingefroren. Bei den Mäusen, die frühzeitig verstarben, wurde die andere Hälfte in $500\ \mu\text{l}$ 0,9%iger NaCl-Lösung gegeben, homogenisiert und in verschiedenen Verdünnungen auf einer Agarplatte ausplattiert (siehe auch Kapitel 2.6.3, S. 29). Bei den Mäusen, die bis zum Versuchsende überlebt hatten, wurde die zweite Milzhälfte zusammen mit der rechten Hemisphäre des Gehirns in 4%igem Formaldehyd bei 4°C für etwa eine Woche inkubiert und fixiert. Das Fixieren dient dazu, das Gewebe zu erhalten und vor Autolyse oder Zerstörung durch Bakterien oder andere Mikroorganismen zu schützen. Außerdem wird durch die spezielle Fixierungsmethode das Gewebe härter und kann später besser geschnitten werden.

2.7.3 Gewebereinbettung in Paraffin

Das Einbetten erfolgte in mehreren Schritten, zunächst musste das Formaldehyd aus dem Gewebe entfernt werden. Dies geschah durch einen Waschvorgang mit H_2O über zwei Stunden. Das Einbetten in Paraffin wurde von einem Gewebereinbettautomat übernommen. Im Anschluss an die Behandlung des Gewebes im Einbettautomaten über 16 Stunden wurde dieses in eine Einbettkassette gelegt und mit heißem Paraffin begossen, sodass ein größerer Paraffinblock entstand.

Der Block konnte nach Abkühlen mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica, Wetzlar) geschnitten werden. Dabei wurden ca. $3\ \mu\text{m}$ dünne koronare Schnitte angefertigt. Der erste Schnitt halbierte die Hemisphäre etwa in der Mitte, es wurde dabei darauf geachtet, dass der Hippokampus mit angeschnitten wurde. Anschließend wurden zwei Schnitte der rechten Großhirn-Hemisphäre angefertigt sowie ein Schnitt des Cerebellums. Die einzelnen Schnitte wurden daraufhin im Wasserbad bei 40°C auf einem Objektträger fixiert.

2.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Allgemeines:

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wird auch H. E.-Färbung genannt und besteht aus den beiden namensgebenden Substanzen Hämatoxylin und Eosin. Sie ist in der Histologie eine der typischen Routinefärbungen. Das Hämatoxylin verursacht eine blau-violette Färbung der Zellkerne sowie einiger basophiler Zytoplasma-Anteile, z.B. des endoplasmatischen

Retikulums. Das Eosin färbt vor allem extrazelluläre faserreiche Komponenten aufgrund ihrer acidophilen Eigenschaften rot an (Welsch 2006).

Procedere:

Für die Färbung der Schnitte musste zunächst das Paraffin aus dem Gewebe entfernt werden. Dazu wurden die Schnitte für zehn Minuten in Xylol gelegt. Dieser Prozess wurde dreimal durchgeführt. Danach erfolgte eine Rehydrierung. Dazu wurde eine absteigende Alkoholkonzentration verwendet. Diese besaß vier verschiedene Konzentrationsstufen (100-96-70-50%iges Ethanol), in die die Objektträger für jeweils drei Minuten hinein getaucht wurden. Um den Alkohol zu entfernen, wurden die Präparate anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte die Färbung mit der Hämalaunlösung nach Mayer für 5 bis 10 min. Nach dem Färbvorgang folgte eine Spülung mit Aqua bidest. (bis das ablaufende Aqua bidest. farblos erschien) und anschließend mit fließendem Wasser für 15 min. Nach dem Spülvorgang mit Aqua bidest. wurden die Schnitte in einer Eosin-G-Lösung unter Zugabe von Eisessig (1 Tropfen pro 100 ml Lösung) für 2 bis 5 min inkubiert. Nach einem erneuten Spülvorgang mit Aqua bidest. erfolgte die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70-96-100%iges Ethanol) für jeweils zweimal zwei Minuten und eine weitere Entwässerung durch Xylol dreimal für drei Minuten. Die Schnitte wurden danach in Kunstharz eingeschlossen.

2.7.5 Thioflavin-S-Färbung

Allgemeines

Mit Hilfe der so genannten Thioflavin-S-Färbung gelingt es, β -Amyloid-Plaques in Gewebeschnitten darzustellen. Es ist eine histologische Färbemethode mit Hilfe des anionischen Farbstoffes Thioflavin S. Dieser Farbstoff ist besonders geeignet, um β -Amyloid nachzuweisen, da er eine hohe Sensitivität für β -Amyloid aufweist (Elghetany und Saleem 1988). Die Verbindung aus Thioflavin S und β -Amyloid kann mit Hilfe von Fluoreszenzmethoden gemessen werden, da sich durch die Bindung des Thioflavin S an die A β -Oligomere eine Emissionsspektrum-Veränderung ergibt. Die Fluoreszenz kann von gelb bis blau variieren. Um eine spätere Analyse zu ermöglichen, wurde vor der Färbung und der Einbettung in Paraffin eine Fixierung in Formalin vorgenommen. Dies führt bei der späteren Färbung und der Untersuchung mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops zu einer einheitlich grünen Fluoreszenz (Elghetany und Saleem 1988). Die Behandlung der Gewebeschnitte wurde nach dem Protokoll von Guntern et al. (1992) durchgeführt.

Procedere (Gunter et al. 1992):

Die mit Hilfe des Mikrotoms entstandenen Gewebeschnitte wurden zunächst wieder entparaffiniert, damit sich das hydrophile Thioflavin im Gewebe anheften konnte. Dies geschah zunächst mit 100%igem Xylol und anschließend mit Hilfe von Alkohol in unterschiedlichen Konzentrationen. Danach wurden die Schnitte 20 Minuten in 0,25%igem Kaliumpermanganat (KMnO_4) getaucht und hinterher in einer Lösung aus 1%igem Kaliumdisulfit ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) und 1%iger Oxalsäure zwei Minuten lang gebleicht. Anschließend folgte eine 20 minütige Inkubation in einer Lösung aus 1 g Natriumhydroxid (NaOH) und 3 ml 30%igem Wasserstoffperoxid auf 100 ml Aqua bidest. Nach dem Bleichen wurden die Schnitte für 5 Sekunden in 0,25%ige Essigsäure gelegt. Damit die verschiedenen Substanzen wirken konnten, wurde zwischen den einzelnen Schritten stets mit Aqua bidest. gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend auf einer Albumin-beschichteten Folie getrocknet, danach rehydriert und später gefärbt. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit 1%igem Thioflavin S, welches in 50%igem Ethanol bis zu einer Konzentration von 0,0125% verdünnt wurde. Die Substanzen wurden 5 min lang auf den Schnitten belassen, um anschließend jeweils zweimal mit 50%igem Ethanol sowie Aqua bidest. gewaschen zu werden. Als Befestigungsmedium diente Fluorescence Mounting Medium (Fluoromount).

Auswertung:

Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop BX51F der Firma Olympus Europe Holding GmbH (Hamburg) mit ultraviolettem Licht und digitaler Kameratechnik untersucht und abfotografiert. Dabei wurde mit einer 400-fachen Vergrößerung, einer Belichtungszeit von 1900 ms und einer Lichtempfindlichkeit von 800 ISO gearbeitet. Anschließend erfolgte die Speicherung als TIF-Datei und die anschließende digitale Auswertung mit dem Programm Definiens (Definiens AG, München) mit freundlicher Unterstützung von Dr. M. Kreutzfeld aus der Abteilung Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen. Die Bestimmung der Fläche erfolgte in Pixel sowie in μm^2 mit Hilfe eines von Dr. M. Kreutzfeld entwickeltem Auswertungs-Logarithmus.

2.7.6 Amyloid- β 1-40- und - β 1-42-ELISA

Allgemeines:

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein Detektionsverfahren, mit dessen Hilfe bestimmte Antikörper oder Antigene durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden können. Der ELISA wurde aus dem Radioimmunoassay (RIA) ent-

wickelt und beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Engvall und Perlmann 1971). Dabei wird eines der beiden Komponenten mit einem Enzym gekoppelt. Die Reaktion zwischen Enzym und Substrat führt zu einer Absorptionsänderung und damit zu einer messbaren Farbveränderung.

Mit Hilfe des ELISAs, der in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, gelang es sowohl das gelöste als auch das ungelöste β -Amyloid 1-40 und 1-42 in den Gehirnen der Tg2576-Mäuse quantitativ nachzuweisen. Für diesen Versuch wurde das Produkt „hAmyloid β 42 und β 40 Brain ELISA“ der Firma „the Genetics Company“ (Schlieren, Schweiz) verwendet. Das Verfahren für den jeweiligen β -Amyloid-Typ war identisch.

Procedere:

Zunächst wurde die eingefrorene hintere Hälfte der linken Hemisphäre des Cerebrums gewogen und 1:10 mit einem Lysis-Puffer vermengt. Der Lysis-Puffer bestand aus einem Puffer-Gemisch, das von der erwähnten Produktherstellerfirma bereitgestellt wurde, und einer Protease-Inhibitor-Lösung. Die entstandene Lösung wurde fünf Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ sonifiziert. Danach wurde das Homogenat bei $+4^{\circ}\text{C}$ auf einer Rüttelplatte über Nacht inkubiert. Um das Lysat von den restlichen Zellstrukturen sowie das lösliche von dem unlöslichen A β abzutrennen, wurde das Homogenat bei $+4^{\circ}\text{C}$ und $13.000 \times g$ für zehn Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet von dem Überstand getrennt. Das Pellet wurde zur Untersuchung des unlöslichen A β und der Überstand für die Untersuchung des löslichen A β verwendet.

Zunächst wurde eine Standardreihe erstellt, um die A β -Menge später quantifizieren zu können. Dazu wurden $5 \mu\text{l}$ eines synthetisch hergestellten Standards des jeweiligen A β -Typs (1-40 oder 1-42) mit einer Konzentration von 1.000 ng/ml mit $495 \mu\text{l}$ eines Verdünnungsmittels der Test-Ausstattung der Firma „the Genetics Company“ vermischt. Dies entsprach einer Konzentration von 10.000 pg/ml . Von dieser Lösung wurden $100 \mu\text{l}$ in $900 \mu\text{l}$ des Diluents gegeben, was einer Konzentration von 1.000 pg/ml entsprach. Von dieser Lösung wurden wiederum $100 \mu\text{l}$ in $100 \mu\text{l}$ des Verdünnungsmittels gegeben. Somit entstand die Konzentrationsstufe 500 pg/ml . Das Schema wurde bis zu einer Konzentration von $15,6 \text{ pg/ml}$ fortgeführt.

Anschließend wurden $30 \mu\text{l}$ des Überstandes der Gehirnproben mit $90 \mu\text{l}$ des Verdünnungsmittels vermischt. Außerdem wurde die Antikörper-Konjugat-Lösung hergestellt. Dazu wurde das von der Firma bereitgestellte Antikörper-Konjugat 1:100 mit einem weiteren Verdünnungsmittel der Test-Ausstattung versetzt.

Für die Bestimmung des A β wurden spezielle Platten verwendet, die mit Antikörpern gegen den jeweiligen A β -Typ beschichtet waren. In jede Vertiefung dieser Platte wurden 50 μ l der Antikörper-Konjugat-Lösung pipettiert. Außerdem wurden 50 μ l der verschiedenen Standards bzw. 50 μ l der Proben nach folgendem Schema dazu gegeben:

	1	2	3
A	1.000 pg/ml Standard	Probe 1	Probe 9
B	500 pg/ml Standard	Probe 2	Probe 10
C	250 pg/ml Standard	Probe 3	Probe 11
D	125 pg/ml Standard	Probe 4	Probe 12
E	62,5 pg/ml Standard	Probe 5	Probe 13
F	31,2 pg/ml Standard	Probe 6	Probe 14
G	15,6 pg/ml Standard	Probe 7	Probe 15
H	Leerprobe (50 μ l Verdünnungsmittel)	Probe 8	Probe 16

Tab. 2: **ELISA Test-Platte.** Proben-Anordnung in der Antikörper-beschichteten Platte.

Die Platte wurde nach dem Pipettieren mit Aluminiumfolie abgedunkelt und für fünf Minuten auf einer Rüttelplatte sowie anschließend über Nacht bei +4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte mit Hilfe einer 1 : 20 mit Aqua bidest. verdünnten Waschlösung in fünf Zyklen gewaschen. Dazu wurde pro Zyklus jeweils 300 μ l der verdünnten Lösung in die Vertiefungen gegeben und durch Klopfen wieder entfernt. Nach dem Waschvorgang wurden jeweils 100 μ l einer Enzym-Lösung (Streptavidin-Peroxidase-Konjugat; 1 : 100 verdünnt) in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde erneut mit einer Aluminiumfolie abgedunkelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem erneuten Waschvorgang (wie oben beschrieben) wurden jeweils 100 μ l einer Substrat-Lösung (TMB/Peroxide-Mischung) in die Vertiefungen gegeben und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Absorptionswerte der Proben bei 620 nm gemessen. Die Messung mittels Multiplate Reader (Firma Tecan, Crailsheim) wurde freundlicherweise von Herrn Peter Lange aus dem neurochemischen Labor unterstützt. Nach der Messung der nicht gestoppten Werte wurden in jede Vertiefung 50 μ l einer Stopp-Lösung gegeben (1 M Schwefelsäure). Anschließend wurde eine Messung bei 450 nm durchgeführt.

Für die Analyse der Pellets wurde zu jedem Pellet das zweifach Volumen 70%ige Ameisensäure dazugegeben und etwa 10 Minuten sonifiziert. Anschließend wurde die

saure Lösung mit dem 15-fachen Volumen 1 M Tris pH 7,4 neutralisiert und mit Hilfe des Vortex vermischt und hinterher für 10 Minuten mit 13.000 x g bei + 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde überführt und für einen erneuten ELISA-Durchgang verwendet. Für das unlösliche A β wurden jeweils 60 μ l der Proben mit jeweils 60 μ l einer Verdünnungslösung verdünnt.

Auswertung:

Die mittels Multiplate Reader (Firma Tecan, Crailsheim) gemessenen A β -Konzentrationen waren in [pg/ml] angegeben. Für die weitere Auswertung wurden diese Konzentrationen in [pg/mg Gehirn] umgerechnet. Durch die Verdünnung des Gehirns zu Beginn des Versuches entstand eine Konzentration von 100 mg Gehirn/ml (1 mg Gehirn in 10 μ l). Für die lösliche A β -Komponente wurde von dieser Lösung 30 μ l in 90 μ l Diluent verdünnt. Dementsprechend mussten die gemessenen Werte des löslichen A β mit 0,04 multipliziert. Das Pellet wurde 17-fach in Ameisensäure und Tris verdünnt und anschließend davon 60 μ l Lösung der Gehirn-Probe in 60 μ l Diluent verdünnt. Hier wurde mit 0,034 multipliziert.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten sowie die graphische Illustration erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.0. Für die nicht-parametrischen Daten wurden jeweils die Mediane sowie die 75%-/25%-Perzentile berechnet. Die Überprüfung von Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen nicht-parametrischer Daten hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz wurde mit Hilfe des U-Tests von Mann-Whitney durchgeführt. Für die Analyse der parametrischen Daten wurden die zugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Für die Prüfung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen wurde der Student's t-test verwendet. Für die Analysen wurde das anerkannte Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert kleiner 0,05 angenommen.

Die statistische Auswertung der Verlaufskurven der Leistungen aus den motorischen Tests (Seil- und Rotarod-Test) und der Leistungen im Water Maze (Schwimm-Zeit, -Strecke und -Geschwindigkeit) wurde mit Hilfe der AUC (Area under the curve; Fläche unter der Kurve) und des U-Tests von Mann-Whitney verglichen. Die statistische Auswertung des Gewichtsverlaufs der Versuchstiere erfolgte mit Hilfe der AUC und des Student's t-test.

Die Auswertung des ELISA sowie der Thioflavin-Färbung erfolgte mit Hilfe des Student's t-test für parametrische Daten.

3 Ergebnisse

Nachstehend erfolgen die graphische Illustration sowie die statistische Analyse der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Zunächst werden die Ergebnisse der Analyse der Trainingsphase vor der Infektion dargestellt. Anschließend wird auf die Auswirkungen der Infektion und deren persistierenden Effekte eingegangen. Zur besseren Darstellung wurden einige Teile des Ergebnisses in einer zusätzlichen Graphik hervorgehoben dargestellt (siehe z.B. Abb. 22).

3.1 Differenzen prae infectione zwischen den $Tg^{+/-}$ - und $Tg^{-/-}$ -Mäusen

Bereits vor der Infektion konnten zwischen den transgenen und den nicht-transgenen Versuchstieren des Tg2576-Stammes Unterschiede hinsichtlich mehrerer Faktoren festgestellt werden. Diese betrafen zum einen das Ausgangsgewicht, zum anderen die Leistungen der Mäuse in den motorischen sowie neuropsychologischen Tests an den ersten drei Versuchstagen. Keine Differenzen gab es bezüglich des Alters. Das mittlere Alter der Mäuse in den beiden Gruppen lag bei ca. 13 Monaten (13,01 Monate \pm 1,75 für die $Tg^{+/-}$ -Mäuse versus 13,12 Monate \pm 1,35 für die $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,74$; siehe Abb. 4).

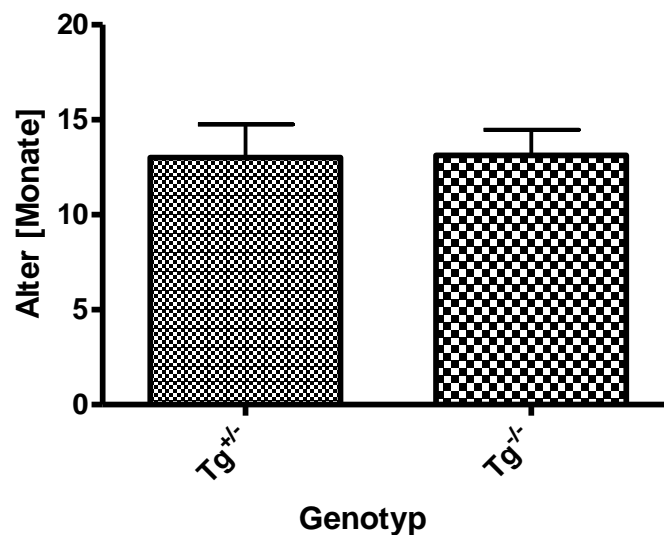


Abb. 4: Alters-Vergleich zwischen den $Tg^{+/-}$ - und $Tg^{-/-}$ -Mäusen zu Beginn des Versuches. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen des Alters in Monaten. Das Alter der $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($n = 44$) und der $Tg^{-/-}$ -Mäuse ($n = 48$) war annäherungsweise identisch ($p = 0,74$).

Auch bezüglich der Farbverteilung zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Mäusen.

3.1.1 Phänotypische Merkmale der transgenen und nicht-transgenen Mäuse

3.1.1.1 Geschlechterverhältnis

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden sowohl die männlichen als auch die weiblichen Mäuse des Stammes Tg2576 verwendet. In der Gruppe der nicht-transgenen Mäuse war das Geschlechterverhältnis ausgeglichen. Für die Versuche wurden 24 weibliche Tg^{-/-}- und 24 männliche Tg^{-/-}-Mäuse verwendet. Bei den transgenen Mäusen überwog die Anzahl der weiblichen Mäuse, es wurden 27 weibliche Tg^{+/-}- und 17 männliche Tg^{+/-}-Mäuse für die Experimente verwendet.

3.1.1.2 Gewichtsdiﬀerenz

Das Ausgangsgewicht wurde zu Beginn der Versuchsreihe vor dem Start der motorischen und neuropsychologischen Tests bestimmt (siehe auch Kapitel 2.4, S. 23). Dabei fiel ein signifikanter Unterschied zwischen den Tg^{+/-}- und Tg^{-/-}-Mäusen auf. Die transgenen Mäuse waren signifikant leichter als die nicht-transgenen Versuchstiere [$26,66 \pm 3,84$ g für die transgenen Mäuse versus $33,46 \pm 5,76$ g für die nicht-transgenen Mäuse (Mittelwert \pm Standardabweichung; $p < 0,0001$); siehe Abb. 5]. Dieser Unterschied könnte auf dem aggressiveren und lebhafteren Verhalten der Tg^{+/-}-Mäuse beruhen.

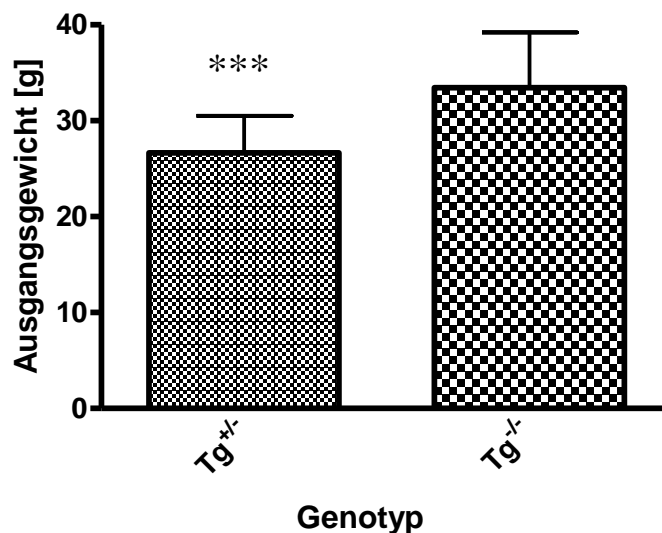


Abb. 5: Vergleich des Ausgangsgewichtes zwischen den Tg^{+/-}- und Tg^{-/-}-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Gewichtes in Gramm[g]. Die Tg^{+/-}-Mäuse (n = 44) waren signifikant leichter als die Tg^{-/-}-Mäuse (n = 48) (***) ($p < 0,0001$).

Bei der Betrachtung des Gewichtes fiel des Weiteren ein geschlechtsabhängiger Gewichtsunterschied auf. Sowohl die weiblichen $Tg^{+/-}$ - als auch die weiblichen $Tg^{-/-}$ -Mäuse waren gegenüber ihren männlichen Artgenossen signifikant leichter [$24,71 \pm 2,525$ g für die weiblichen $Tg^{+/-}$ - versus $29,76 \pm 3,552$ g für die männlichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($p < 0,0001$) sowie $30 \pm 4,78$ g für die weiblichen $Tg^{-/-}$ - versus $36,93 \pm 4,47$ g für die männlichen $Tg^{-/-}$ -Mäuse ($p < 0,0001$); siehe Abb. 6].

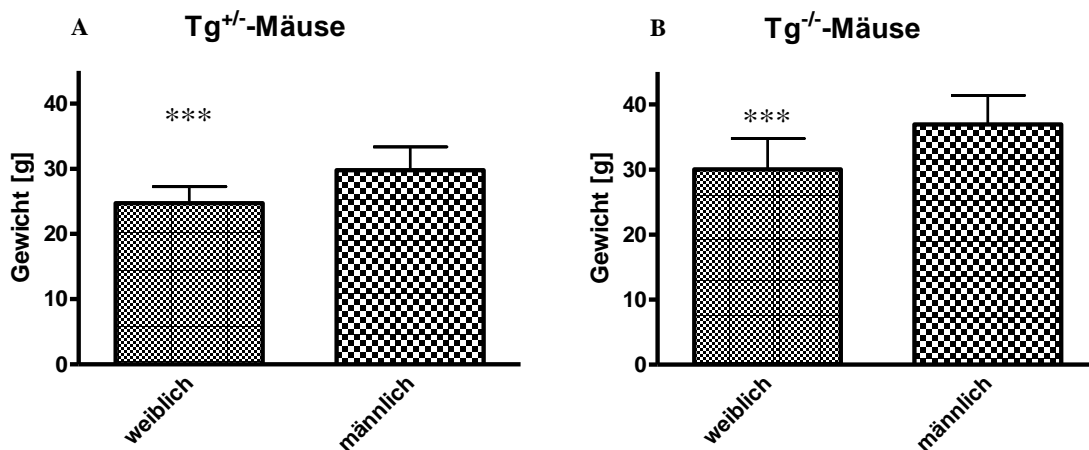


Abb. 6: Geschlechtsspezifischer Vergleich des Ausgangsgewichtes der $Tg^{+/-}$ - und $Tg^{-/-}$ -Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen des Gewichtes in Gramm [g]. **A:** Die weiblichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($n = 27$) waren signifikant leichter als die männlichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($n = 17$) (***) $p < 0,0001$. **B:** Der gleiche Unterschied zeigte sich auch bei den $Tg^{-/-}$ -Mäusen. Die weiblichen ($n = 24$) waren signifikant leichter als die männlichen Mäuse ($n = 24$) (***) $p < 0,0001$.

3.1.2 Motorische Tests

Die motorischen Fähigkeiten wurden mit Hilfe des Seil-Tests sowie des Rotarod-Tests überprüft. In den ersten drei Versuchstagen sollten die Mäuse diese beiden Tests erlernen. Es wurde pro Tag und Maus jeweils ein Versuch durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.4, S. 23).

Bei der Analyse des Rotarod-Tests fiel auf, dass die $Tg^{+/-}$ -Mäuse sich signifikant länger auf dem Rotarod-Laufrad halten konnten als die $Tg^{-/-}$ -Mäuse [Area under the curve, AUC (Sekunden x Tage): $398,5$ ($319,3/543,6$) für die $Tg^{+/-}$ -Mäuse vs. $334,5$ ($252,5/477,3$) für die $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,0145$; siehe Abb. 7].

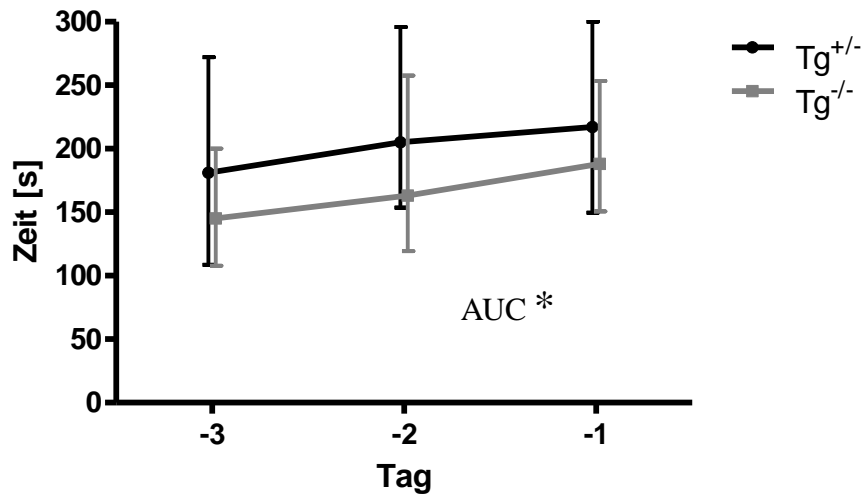


Abb. 7: Motorische Leistungen im Rotarod-Test während der Trainingsphase. Die Analyse erfolgte anhand der verbrachten Zeit der Mäuse auf dem Rotarod-Laufrad in Sekunden [s]. In der Graphik sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile dargestellt. Die Tg^{+/-}-Mäuse (n = 44) blieben signifikant länger auf dem Laufrad als die Tg^{-/-}-Mäuse (n = 42). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den AUCs (* p < 0,05).

Bei der Auswertung des Seil-Tests konnte keine Signifikanz hinsichtlich der AUCs über den gesamten Bereich der Trainingsphase gefunden werden [AUC (Punktzahl x Tage): 20 (16/21) für die Tg^{+/-}-Mäuse vs. 17 (14/20) für die Tg^{-/-}-Mäuse; p = 0,127; siehe Abb. 8].

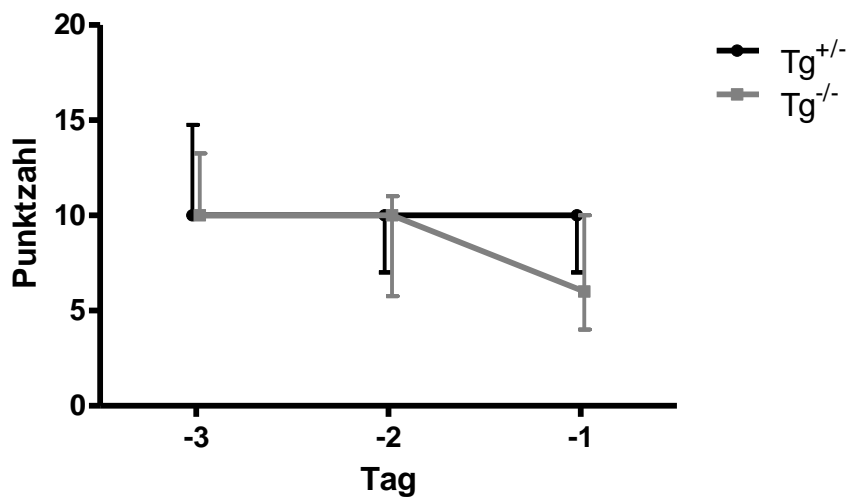


Abb. 8: Motorische Leistungen im Seil-Test während der Trainingsphase. Die Analyse erfolgte anhand von festgelegten Punktzahlen (siehe Kapitel 2.5.3, S. 27). In der Graphik sind die Mediane der Punktzahlen sowie die 25./75. Perzentile der beiden Gruppen gegenübergestellt. Die Tg^{+/-}-Mäuse (n = 44) waren während der Trainingsphase nicht signifikant schlechter als die Tg^{-/-}-Mäuse (p = 0,127).

3.1.3 Neuropsychologische Tests

Für die Überprüfung der neuropsychologischen Fähigkeiten wurde der Water-Maze-Test durchgeführt. In den ersten drei Tagen vor der Infektion wurden jeweils sechs Durchläufe pro Tag und Maus durchgeführt (siehe auch Kapitel 2.5.1, S. 24). Dabei wurden jeweils die Schwimm-Zeiten, -Strecken und -Geschwindigkeiten detektiert und analysiert.

Bei der Analyse der Schwimm-Zeiten fiel kein signifikanter Unterschied zwischen den $Tg^{+/-}$ - und den $Tg^{-/-}$ -Mäusen auf. Die $Tg^{+/-}$ -Mäuse benötigten dementsprechend die gleiche Zeit, um die Plattform zu finden und die Lokalisation der Plattform zu erlernen [AUC (Sekunden x Tage): 142,6 (87,0/172,3) für die $Tg^{+/-}$ -Mäuse versus 137,1 (79,1/165,1) für die $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,285$; siehe Abb. 9].

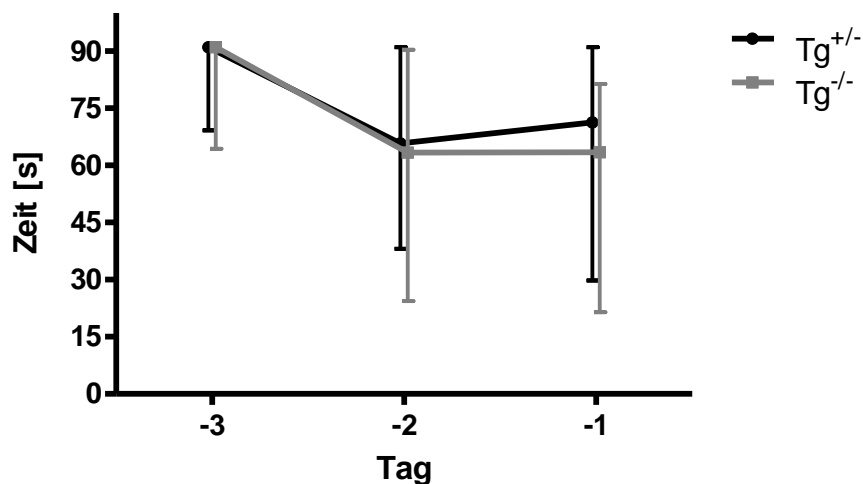


Abb. 9: Neuropsychologische Tests: Vergleich der Schwimm-Zeiten im Water Maze während der Trainingsphase. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Schwimmzeiten in Sekunden [s] bis zum Erreichen der versteckten Plattform (sechs einzelne Läufe jeder Maus). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei der Betrachtung der AUC bezüglich der Zeit bis zum Finden der Plattform zwischen den $Tg^{+/-}$ - ($n = 44$) und $Tg^{-/-}$ -Mäusen ($n = 42$) ($p = 0,285$).

Im Gegensatz zu der Schwimm-Zeit fiel bei der Analyse der Schwimm-Strecke eine Differenz zwischen den $Tg^{+/-}$ - und den $Tg^{-/-}$ -Mäusen auf. Die $Tg^{+/-}$ -Mäuse schwammen eine signifikant längere Strecke, als die $Tg^{-/-}$ -Mäuse [AUC (Meter x Tage): 20,33 (14,68/23,03) für die $Tg^{+/-}$ - vs. 14,22 (11,15/19,33) für die $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,0064$; siehe Abb. 10].

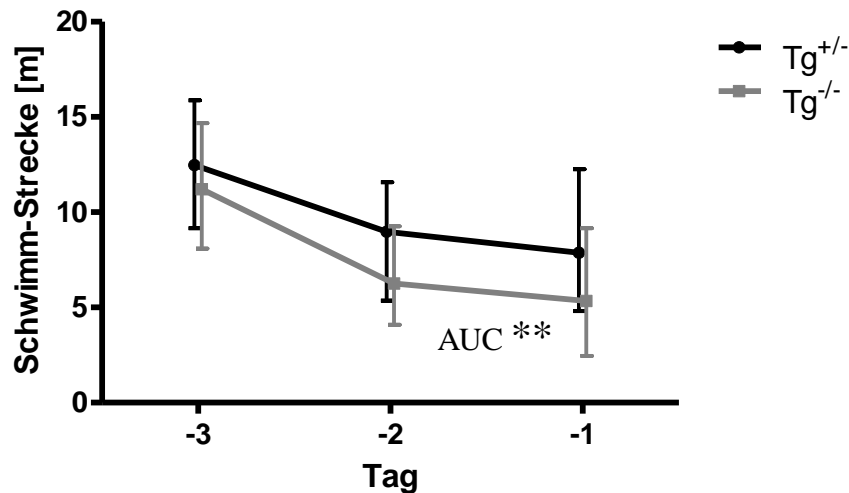


Abb. 10: Neuropsychologische Tests: Vergleich der Schwimm-Strecke im Water Maze während der Trainingsphase. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Schwimmstrecken in Meter [m]. Die Tg^{+/-}-Mäuse (n = 44) schwammen eine signifikant längere Strecke als die Tg^{-/-}-Mäuse (n = 42) (** p < 0,01).

Bei der Analyse der Schwimm-Geschwindigkeit im Water Maze fiel kein signifikanter Unterschied zwischen den Tg^{+/-}- und Tg^{-/-}-Mäusen auf [AUC (Zentimeter/Sekunden x Tage): 32,97 (24,67/40,99) für die Tg^{+/-}-Mäuse versus 31,12 (22,57/36,17) für die Tg^{-/-}-Mäuse; p = 0,212; siehe Abb. 11].

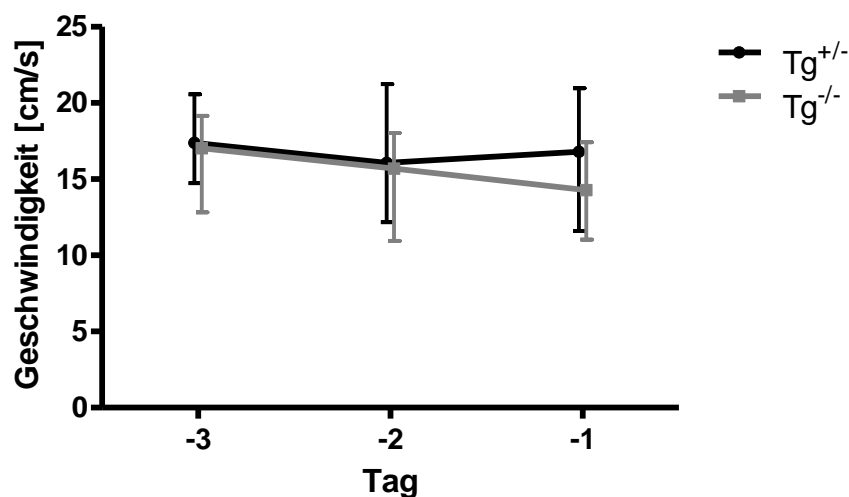


Abb. 11: Neuropsychologische Tests: Vergleich der Schwimm-Geschwindigkeit im Water Maze während der Trainingsphase. Dargestellt sind die Mediane und die 25./75. Perzentile der Schwimm-Geschwindigkeiten in [cm/s]. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Tg^{+/-}- (n = 44) und Tg^{-/-}-Tieren (n = 42); (p = 0,212).

3.2 Differenzen post infectionem zwischen den Tg^{+/-}- und Tg^{-/-}-Mäusen

Die Infektion mit dem Bakterium *E. coli* erfolgte am Tag 0 des Versuches. Vor der Infektion wurden sowohl die transgenen als auch die nicht-transgenen Mäuse der Tg2576-Linie in zwei Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe wurde mit dem Bakterium intrazerebral infiziert, die andere Gruppe erhielt eine äquivalente Menge NaCl-Lösung intrazerebral appliziert. Die akute Infektionsphase betrug 41 Stunden, danach wurde mit der Antibiose begonnen (siehe auch Kapitel 2.6.5, S. 30).

3.2.1 Gewichtsverlauf

Bereits vor der Infektion lag ein deutlicher Unterschied zwischen den transgenen und den nicht-transgenen Mäusen des Tg2576-Stammes bezüglich des Ausgangsgewichtes vor. Diese Differenz bestand bis zum Versuchsende [AUC (Gramm x Tage): 874 (790,3/957,8) für die Tg^{+/-}-Mäuse versus 960,1 (863,2/1088) für die Tg^{-/-}-Mäuse; $p = 0,0197$].

Durch die Infektion mit dem Bakterium *E. coli* verloren sowohl die transgenen als auch die nicht-transgenen Mäuse an Gewicht. Wie in Kapitel 2.6.4 (S. 30) beschrieben, ist dieser Gewichtsverlust ein Zeichen einer stattfindenden Meningitis. Der stärkste Gewichtsverlust trat in den ersten zwei Tagen nach der Infektion auf. Danach nahmen die Mäuse durch die Bekämpfung der Infektion mit dem Antibiotikum wieder an Gewicht zu bzw. verloren nicht weiter an Gewicht. Die Gewichtsabnahme in den ersten zwei Tagen nach der Infektion zeigte sowohl bei den Tg^{+/-}- als auch bei den Tg^{-/-}-Mäusen eine statistische Signifikanz [Gepaarter t-Test: für die Tg^{+/-}-Mäuse ($n = 21$) zeigte sich ein mittlerer Gewichtsverlust von 1,83 g (0,94/2,73; $p = 0,0004$) und für die Tg^{-/-}-Mäuse ($n = 21$) ein Gewichtsverlust von 2,31 g (1,63/3,00; $p < 0,0001$)].

Bei dem Vergleich des Gewichtsverlustes zwischen den Tg^{+/-}- und den Tg^{-/-}-Mäusen während der Infektionsphase fiel kein signifikanter Unterschied auf. Die transgenen Mäuse zeigten am zweiten Tag gegenüber dem Tag der Infektion eine Gewichtsabnahme von etwa 6,8%, wohingegen die nicht-transgenen Mäuse eine Gewichtsabnahme von 7,8% zeigten. [Prozentsatz des Gewichtsverlustes zwischen dem Tag der Infektion (Tag 0) und zwei Tagen nach der Infektion (Tag 2) der Tg^{+/-}-Mäuse ($n = 21$) vs. Prozentsatz des Gewichtsverlustes der Tg^{-/-}-Mäuse ($n = 21$): $-6,8\% \pm 7,3\%$ für die Tg^{+/-}- versus $-7,8\% \pm 5,5\%$ für die Tg^{-/-}-Mäuse; $p = 0,604$; siehe Abb. 12].

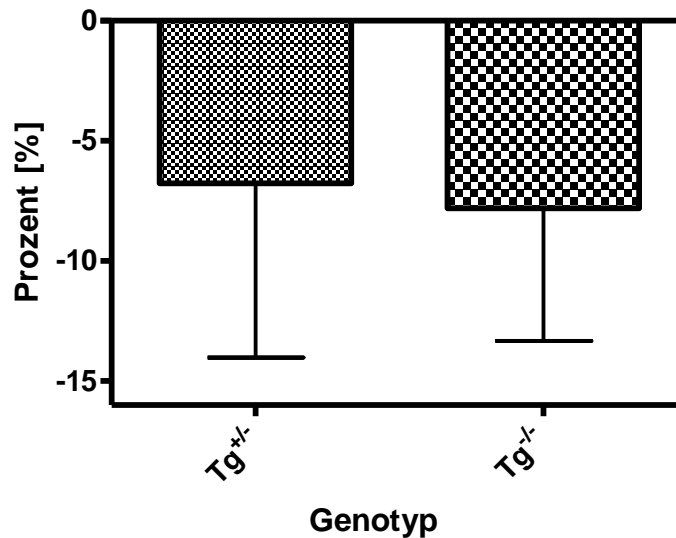


Abb. 12: Gewichtsverluste in Prozent vom Tag 0 bis Tag 2 zwischen den Tg^{+/-}- und den Tg^{-/-}-Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Prozentsätze des Gewichtsverlustes sowie die Standardabweichungen in Prozent [%]. In der akuten Infektionsphase zeigte sich bei beiden Gruppen ein deutlicher Gewichtsverlust. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tg^{+/-}- (n = 21) und Tg^{-/-}-Mäusen (n = 21) (p = 0,604).

Der Vergleich der Gewichtsverluste zwischen den infizierten Tg^{+/-}- und den nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäusen sowie zwischen den infizierten Tg^{-/-}- und den nicht-infizierten Tg^{-/-}-Mäusen während der Infektionsphase zeigte aufgrund der großen interindividuellen Gewichtsunterschiede keinen signifikanten Unterschied. Es zeigte sich aber eine Tendenz, dass die infizierten Mäuse erheblich stärker an Gewicht verloren als die nicht-infizierten Tiere [Prozentsatz des Gewichtsverlustes zwischen dem Tag 0 und dem Tag 2 der infizierten Tg^{+/-}-Mäuse (n = 21) vs. Prozentsatz des Gewichtsverlustes der nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäuse (n = 14): -6,8% ± 7,3% für die infizierten Tg^{+/-}- versus -4,4% ± 6,7% für die nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäuse; p = 0,33; Prozentsatz des Gewichtsverlustes zwischen dem Tag 0 und dem Tag 2 der infizierten Tg^{-/-}-Mäuse (n = 21) vs. Prozentsatz des Gewichtsverlustes der nicht-infizierten Tg^{-/-}-Mäuse (n = 17): -7,8% ± 5,5% für die infizierten Tg^{-/-}- versus -3,8% ± 6,9% für die nicht-infizierten Tg^{-/-}-Mäuse; p = 0,05].

Bei dem Geschlechter-Vergleich des Ausgangsgewichtes konnte ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die weibliche Tiere waren sowohl in der transgenen als auch in

der nicht-transgenen Gruppe signifikant leichter (siehe auch Kapitel 3.1.1.2, S. 39). Beim Vergleich des Gewichtsverlustes unter der Infektion konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren gefunden werden, allerdings verloren die nicht-transgenen Weibchen tendenziell mehr an Gewicht als die männlichen Artgenossen [Student's t-Test: $-5,3\% \pm 6,9\%$ für die weiblichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse vs. $-8,6\% \pm 7,7\%$ für die männlichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($p = 0,333$); $-9,4\% \pm 6,1\%$ für die weiblichen $Tg^{-/-}$ -Mäuse vs. $-5,2\% \pm 3,3\%$ für die männlichen $Tg^{-/-}$ -Mäuse ($p = 0,092$); siehe Abb. 13].

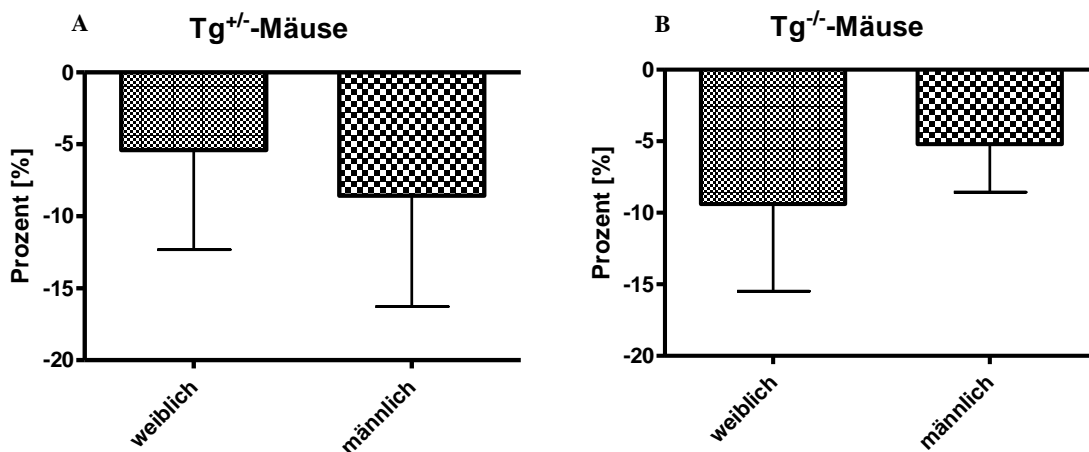


Abb. 13: Vergleich der Prozentsätze der Gewichtsverluste in den Tagen 0 bis 2 zwischen den weiblichen und männlichen Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Prozentsätze des Gewichtsverlustes sowie die Standardabweichungen in [%]. **A:** Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen ($n = 8$) und den weiblichen $Tg^{+/-}$ -Tieren ($n = 13$) gefunden werden, $p = 0,333$. **B:** Bei den $Tg^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen ($n = 9$) und den weiblichen $Tg^{-/-}$ -Mäusen ($n = 12$), es konnte aber eine Tendenz eines geringeren Gewichtsverlustes zugunsten der männlichen Mäuse beobachtet werden ($p = 0,092$).

3.2.2 Sterblichkeit

Im Verlauf der Versuche verstarben 18 Mäuse, vier dieser Tiere verstarben bei der Anästhesie. Eine weitere Maus verstarb aufgrund einer Gehirnblutung. Von den übrigen 13 frühzeitig verstorbenen Mäusen, die während des akuten Infektionsstadiums verstarben, waren vier Mäuse Kontroll-Tiere, die infiziert wurden, um nachzuweisen, dass die Infektion stark genug war. Die Sterblichkeitsrate der übrigen $Tg^{+/-}$ -Mäuse lag bei 21,7 % und die Sterblichkeitsrate der $Tg^{-/-}$ -Mäuse bei 21,1 % (siehe Abb. 14. sowie Tab. 3). Die Mäuse, die eine intrazerebrale Injektion mit 0,9%iger NaCl-Lösung verabreicht bekommen hatten, überlebten bis zum Ende der tierexperimentellen Versuche.

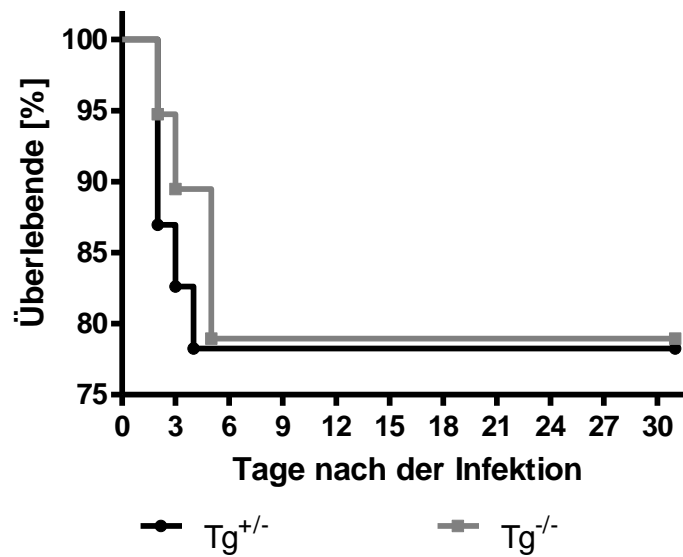


Abb. 14: Kaplan-Meier-Kurven der Überlebensraten. Dargestellt sind die Überlebensraten der Tg^{+/-}- und der Tg^{-/-}-Mäuse. Beim Vergleich der Sterblichkeit der Mäuse, die nach 41 Stunden mit Antibiotika behandelt wurden, fiel kein signifikanter Unterschied zwischen den Tg^{+/-}- (n = 23) und den Tg^{-/-}-Mäusen (n = 19) auf (log-rank Test: p = 0,8287). Die an Narkose- beziehungsweise Infektionskomplikationen verstorbenen Mäuse sind hier nicht berücksichtigt.

Genotyp	Injektion	nVersuchsbeginn	nVersuchsende	nVerstorben
Tg ^{+/-}	<i>E. coli</i>	23	18	5 (21,7%)
	NaCl 0,9%	14	14	0
Tg ^{-/-}	<i>E. coli</i>	19	15	4 (21,1%)
	NaCl 0,9%	17	17	0

Tab. 3: Sterblichkeit nach Genotyp.

3.2.3 Intrazerebrale und systemische Bakterienkonzentration

Während der akuten Infektionsphase verstarben neun Mäuse aufgrund der Infektion (siehe Tab.3). Um nachzuweisen, dass ihr Tod aufgrund der Infektion geschah und um den Verlauf der Infektion und der damit verbundenen Bakterien-Besiedlung zu bestimmen, wurde nach ihrem Tod die Bakterienkonzentration im Cerebellum sowie in der Milz bestimmt.

Wie oben erwähnt verstarb eine Maus bereits in der ersten Nacht an einer intrazerebralen Blutung, die durch die Injektion entstanden war. Die Bakterienlast im Cerebellum betrug 3,4 [log CFU/ml]. In der Milz lag die Bakterienkonzentration unter 2,3 [log CFU/ml], dementsprechend hatte sich die Infektion noch nicht auf dem systemischen Weg ausbreiten können.

Am zweiten Tag nach der Infektion verstarben vier Mäuse, von denen eine nicht-transgen war und drei transgen waren. Die mittlere Bakterienkonzentration lag bei den $Tg^{+/-}$ -Mäusen im Cerebellum bei $6,2 \pm 6,1$ [log CFU/ml] und bei der $Tg^{-/-}$ -Maus bei 6,6 [log CFU/ml] und in der Milz der $Tg^{+/-}$ -Mäuse bei $4,4 \pm 4,4$ [log CFU/ml] und bei der $Tg^{-/-}$ -Maus bei 4,6 [log CFU/ml] (siehe Abb. 15).

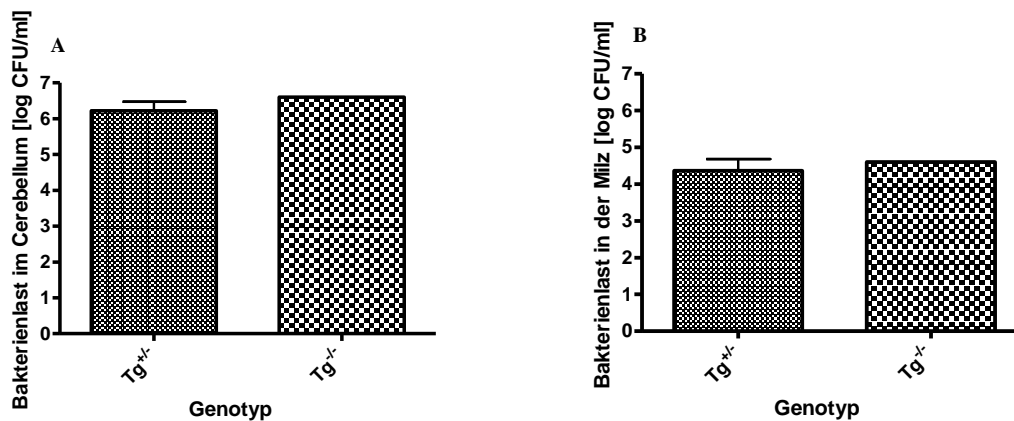


Abb. 15: Bakterienkonzentrationen in Cerebellum und Milz am 2. Tag nach der Infektion; Vergleich $Tg^{+/-}$ und $Tg^{-/-}$ -Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Bakterienkonzentrationen am 2. Tag nach der Infektion in [log CFU/ml]. **A:** Vergleich der Konzentrationen im Cerebellum zwischen den am 2. Tag verstorbenen $Tg^{+/-}$ - ($n = 3$) und $Tg^{-/-}$ -Mäusen ($n = 1$). **B:** Vergleich der Bakterienkonzentration in der Milz.

Am dritten Tag verstarben trotz bereits begonnener Antibiose weitere zwei Mäuse, wovon eine transgen und eine nicht-transgen war. Die Bakterienkonzentration im Cerebellum der $Tg^{+/-}$ -Maus lag bei 6,0 [log CFU/ml] und in der Milz bei 4,8 [log CFU/ml]. Die Bakterienkonzentration im Cerebellum der $Tg^{-/-}$ -Maus lag bei 6,3 [log CFU/ml] und in der Milz bei 4,9 [log CFU/ml].

In den darauf folgenden Tagen verstarben trotz laufender Antibiose noch drei weitere Mäuse, von denen zwei nicht-transgen und eine transgen war. Bei der transgenen Maus lag die mittlere Bakterienkonzentration sowohl im Cerebellum als auch in der Milz unter 2,3 [log CFU/ml]. Bei den nicht-transgenen Tieren lag die mittlere Bakterienlast im Cerebellum bei $4,4 \pm 3,9$ [log CFU/ml] und in der Milz bei unter 2,3 [log CFU/ml], sodass angenommen werden konnte, dass die Bakterien sensibel für das Antibiotikum waren und der Tod durch die durch das Bakterium entstandenen irreparablen Schäden eingetreten war.

Die rechten Hemisphären wurden in Formalin eingebettet und mit der HE-Färbung gefärbt. Bei der mikroskopischen Betrachtung der histologischen Schnitte konnten bei den unter der Infektion verstorbenen Mäusen entzündliche Veränderungen der Meningen beobachtet werden. Des Weiteren konnte auch eine Mitbeteiligung des Gehirnparenchyms im Sinne von Bakterienansammlungen sowie ödematösen Veränderungen beobachtet werden. Die am Ende des Versuches getöteten Mäuse wiesen hingegen keine Entzündungszeichen auf.

3.3 Langfristiger Einfluss der Infektion auf den Gewichtsverlauf

Zunächst soll auf den Einfluss der Infektion auf den Gewichtsverlauf zwischen den infizierten und den nicht-infizierten transgenen Mäusen eingegangen werden und anschließend auf den Einfluss auf die nicht-transgenen Tiere.

Der Gewichtsverlust, der zu Beginn der Infektion auftrat (siehe Kapitel 3.2.1, S. 44), war nach dem Beginn der Antibiose wieder rückläufig (siehe Abb. 16).

Über den gesamten Verlauf des Versuches gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Gewichtes zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen [AUC (Gramm x Tage): 874 (790/958) für die *E. coli*-infizierten Mäuse versus 854 (779/1024) für die nicht-infizierten Mäuse; Mann-Whitney U-Test: $p = 0,9243$; siehe Abb. 16].

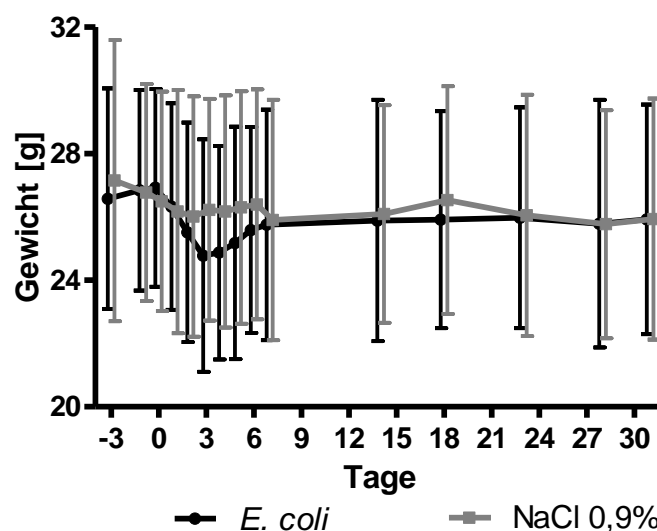


Abb. 16: Gewichtsverlauf der $Tg^{+/-}$ -Mäuse: Vergleich der infizierten und der nicht-infizierten Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte des Gewichtes sowie die Standardabweichungen in Gramm [g]. Es zeigte sich kein signifikanter Gewichtsunterschied

zwischen den infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse (n = 18) und den nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäusen (n = 14) bei der Betrachtung des gesamten Zeitraum des Versuches (p = 0,9243).

Bei den nicht-transgenen Tieren zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Mäusen bezüglich des Gewichtes im Verlauf der Versuche [AUC (Gramm x Tage): 960 (863/1088) für die *E. coli*-infizierten Mäuse versus 1055 (1017/1193) für die nicht-infizierten Mäuse; Mann-Whitney U-Test: p = 0,0699; siehe Abb. 17]. Die infizierten Mäuse waren jedoch tendenziell leichter als die nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Tiere. Außerdem zeigte sich bereits während der Trainingsphase sowohl bei den infizierten als auch bei den nicht-infizierten Tieren ein Gewichtsverlust, der am ehesten auf die verstärkte Anstrengung in der Trainingsphase zurückzuführen ist.

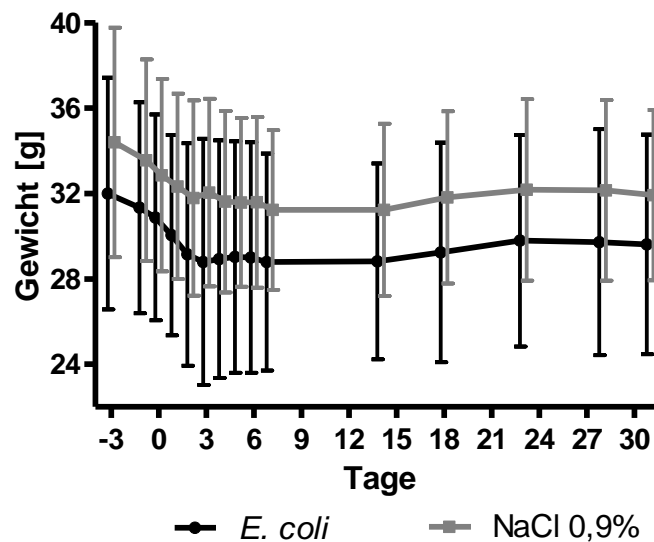


Abb. 17: Langfristiger Gewichtsverlauf der $Tg^{-/-}$ -Mäuse: Vergleich der infizierten und der nicht-infizierten Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte des Gewichtes sowie die Standardabweichungen in Gramm [g]. Über den gesamten Zeitraum des Versuches gab es ebenso wie bei den transgenen Tieren keinen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen der infizierten (n = 15) und der nicht-infizierten Gruppe (n = 17; p = 0,0699).

3.4 Langfristiger Einfluss der Infektion auf die motorischen Tests

Um auszuschließen, dass durch die Infektion motorische Defizite entstanden waren, wurden zwei motorische Tests durchgeführt, der Seil-Test sowie der Rotarod-Test.

3.4.1 Seil-Test

Im Seil-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen gefunden werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die motorischen Leistungsfähigkeiten der infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse durch die Infektion nicht eingeschränkt waren [AUC (Punktzahl x Tage): 294 (230/313) für die infizierten versus 220 (190/308) für die nicht-infizierten Mäuse; $p = 0,2099$].

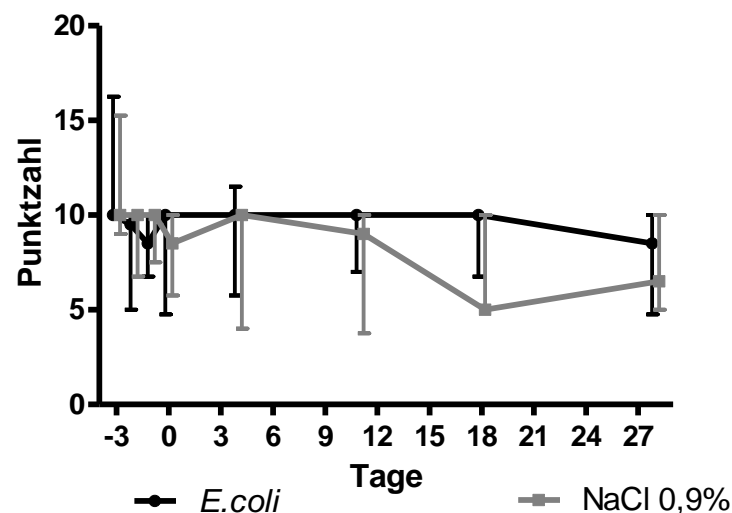


Abb. 18: Seil-Test: Vergleich der $Tg^{+/-}$ -Mäuse. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Punktzahlen. Bei dem Vergleich der infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($n = 18$) mit den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen ($n = 14$) konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden ($p = 0,21$).

Bei den $Tg^{-/-}$ -Tieren konnte hingegen eine signifikante Differenz gefunden werden. Die nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse waren signifikant motorisch besser als die infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse [AUC (Punktzahl x Tage): 208 (172/274) für die infizierten vs. 134 (100/217) für die nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,034$].

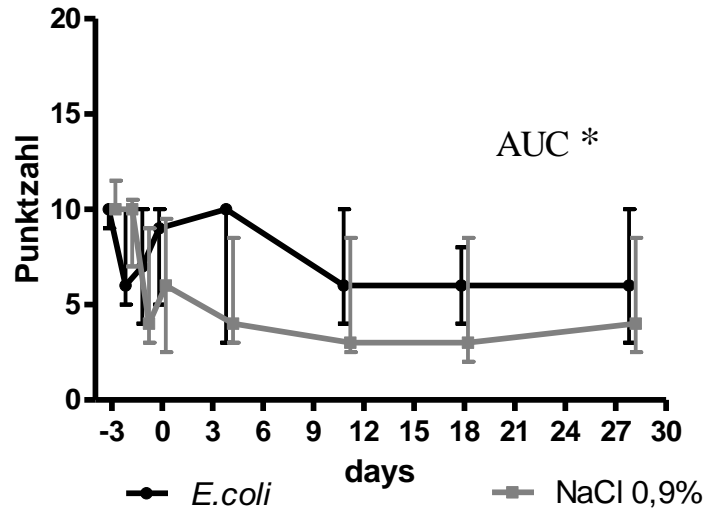


Abb. 19: Seil-Test: Vergleich der $Tg^{-/-}$ -Mäuse. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Punktzahlen im Seil-Test. Die infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse (n = 15) waren signifikant schlechter als die nicht-infizierten Mäuse (n = 17) (* p = 0,034).

3.4.2 Rotarod-Test

Auch bei dem Rotarod-Test konnte kein signifikanter Unterschied nach der Infektion zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen beobachtet werden [AUC (Sekunden x Tage): 8035 (6494/8476) für die infizierten Mäuse versus 8118 (6553/9102) für die nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse; p = 0,718].

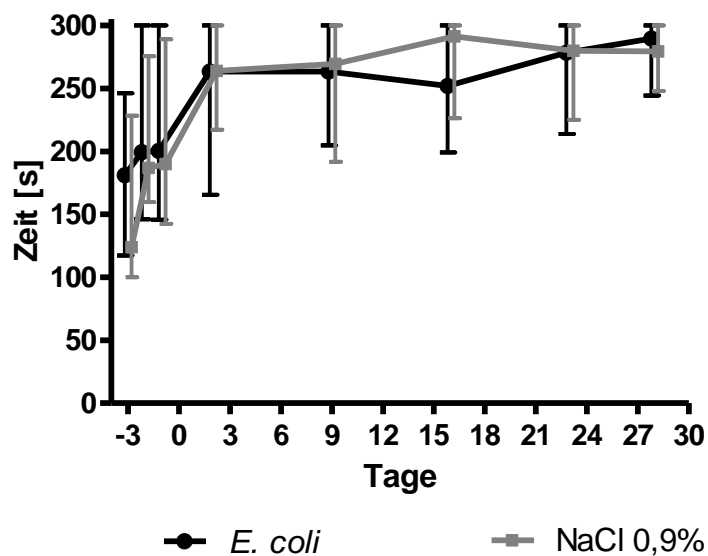


Abb. 20: Rotarod-Test, Vergleich zwischen der infizierten und der nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Gruppe. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Zeiten in

Sekunden [s]. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der infizierten (n = 18) und der nicht-infizierten (n =14) Gruppe der $Tg^{+/-}$ -Mäuse gefunden werden ($p = 0,718$).

Auch in der $Tg^{-/-}$ -Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied bei der Betrachtung der Leistungen im Rotarod-Test beobachtet werden. Es lag jedoch eine Tendenz vor, dass die infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse etwas schlechter waren [AUC (Sekunden x Tage): 6130 (4199/8160) für die infizierten versus 7605 (5761/8658) für die nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,183$].

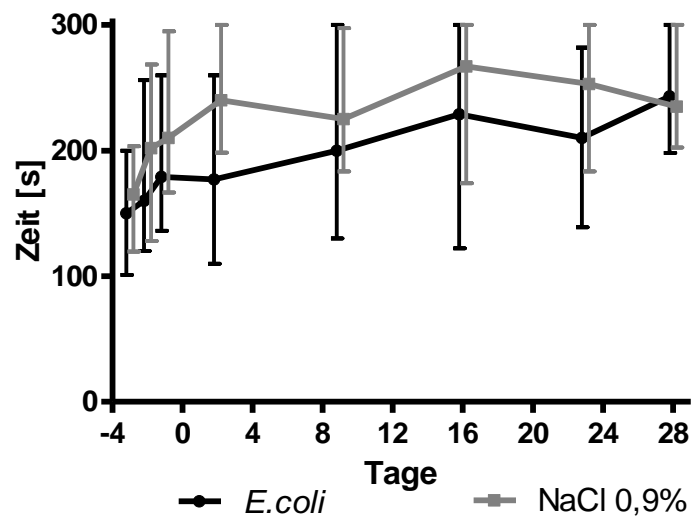


Abb. 21: Rotarod-Test: Vergleich zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Zeiten in Sekunden [s]. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der infizierten (n = 15) und der nicht-infizierten (n =17) Gruppe der $Tg^{-/-}$ -Mäuse gefunden werden ($p = 0,183$).

3.5 Langfristiger Einfluss der Infektion auf die neuropsychologischen Tests

In der Trainingsphase vor der Infektion gab es zwischen den Tg^{+/-}- und den Tg^{-/-}-Mäusen des Stammes Tg2576 keinen signifikanten Unterschied bei der Betrachtung der Zeit bis zum Auffinden der Plattform und der Schwimm-Geschwindigkeit im Morris-Water-Maze-Experiment. Es gab lediglich einen signifikanten Unterschied bei der Betrachtung der Schwimm-Strecke. Nach der Infektion und der antibiotischen Behandlung wurden wiederholt Versuche mit dem Water Maze durchgeführt, um die Funktion des Gedächtnisses, im Sinne des Aufrufens bereits erlernter Begebenheiten zu überprüfen. Am Ende des Experimentes, vier Wochen nach der Infektion, wurde schließlich die unsichtbare Plattform versetzt, um zu untersuchen, ob eine Differenz im Neu-Lernen zu erkennen war (siehe auch Kapitel 2.5.1, S. 24). Im Folgenden ist der Einfluss der Infektion auf die Tg^{+/-}-Mäuse im Water Maze dargestellt, indem die nicht-infizierten mit den infizierten Mäusen verglichen werden. Des Weiteren wird auf den Einfluss der Infektion auf die Tg^{-/-}-Mäuse eingegangen.

3.5.1 Einfluss der Infektion auf die Leistungen der Tg^{+/-}-Mäuse

Die Schwimm-Zeiten im Water Maze direkt vor der Infektion waren nicht signifikant unterschiedlich [Mann-Whitney U-Test Tag 0: 48,21 (13,85/91) s für die infizierten versus 75,9 (18,2/91) s für die nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäuse; $p = 0,7126$]. Nach der intrazerebralen Infektion zeigte sich ebenfalls kein signifikant unterschiedlicher Verlauf der Schwimm-Zeiten der Tg^{+/-}-Mäuse [AUC Tag 7 bis Tag 27 (Sekunden x Tage): 1206 (652/1611) für die infizierten versus 1105 (449/1508) für die nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäuse; $p = 0,4818$]. Beide Gruppen brauchten mehr Zeit um die Plattform zu finden.

Am 29. Versuchstag wurde die Plattform an eine neue Lokalisation verschoben. Der Ablauf entsprach annähernd dem der Trainingsphase zu Beginn der Versuchsreihe (siehe auch Kapitel 2.5.1, S. 24). In der Lernphase der neuen Lokalisation zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten Tg^{+/-}-Mäusen und den nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäusen. Den mit *E. coli*-infizierten transgenen Mäuse des Stammes Tg2576 gelang es nicht, die neue Lokalisation der Plattform zu erlernen [AUC Tag 29 bis Tag 31 (versetzte Plattform) (Sekunden x Tage): 169 (109/182) für die mit infizierten Tg^{+/-}-Mäuse versus 113 (89/148) für die nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäuse; $p = 0,0487$; siehe Abb. 22]. Dies deutet auf eine eingeschränkte Lernfunktion, bei erhaltener Gedächtnisfunktion für ältere Ereignisse, der mit dem Bakterium *E. coli*-infizierten Tg^{+/-}-Mäuse hin.

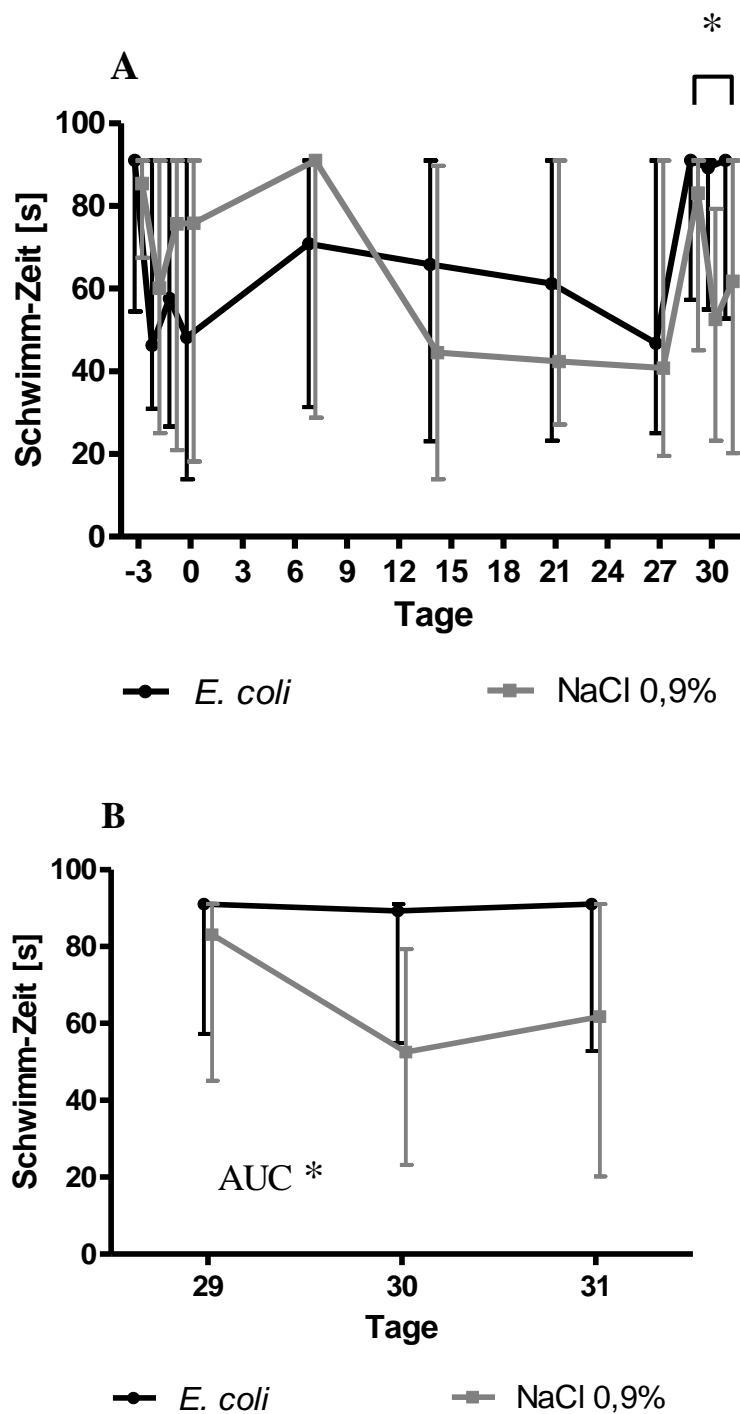


Abb. 22: Vergleich der Water-Maze-Schwimm-Zeiten zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind die Mediane und die 25./75. Perzentile der Zeiten in Sekunden [s]. **A:** Gesamt Water-Maze-Versuch. **B:** Versetzte Plattform (Tag 29 bis 31). In der letzten Phase des Versuches wurde die Plattform im Water Maze versetzt. Bei dem Erlernen der neuen Lokalisation der Plattform fiel auf, dass die infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse (n = 18) im Gegensatz zu den nicht-infizierten Mäusen nicht in der Lage waren, die neue Lokalisation zu erlernen (* p < 0,05).

Bei der Beurteilung der Schwimm-Strecken sowie der Schwimm-Geschwindigkeiten fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse auf [AUC Schwimm-Strecke (Meter x Tage): 280 (188/420) für die infizierten Mäuse vs. 295 (183/380) für die nicht-infizierten Mäuse; $p = 0,8942$; AUC Schwimm-Geschwindigkeiten (Zentimeter/Sekunden x Tage): 578 (466/703) für die infizierten Mäuse vs. 596 (482/716) für die nicht-infizierten Mäuse; $p = 0,5818$; siehe Abb. 23].

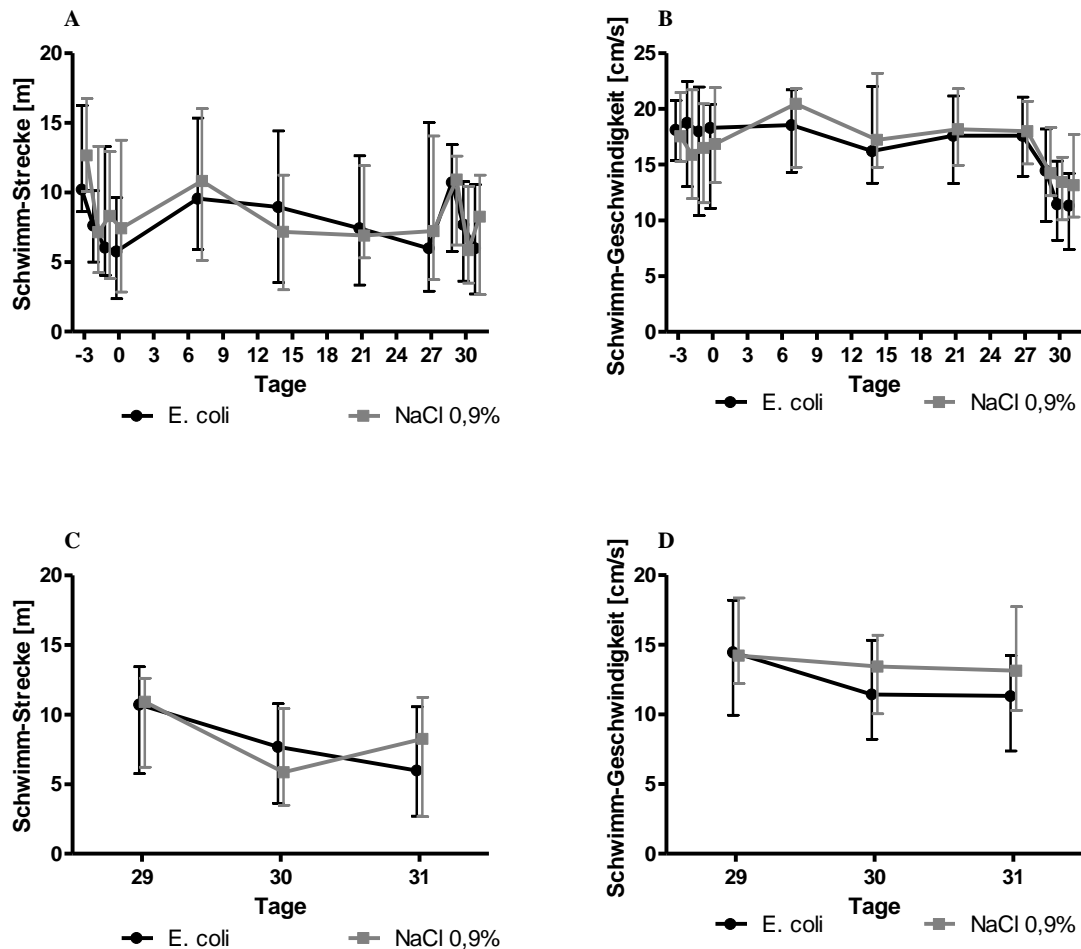


Abb. 23: Vergleich der Schwimm-Strecke und der Schwimm-Geschwindigkeit im Water-Maze-Versuch zwischen den infizierten und nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen. A + B: Gesamter Water-Maze-Versuch. C + D: Versetzte Plattform (Tag 29 bis 31). A + C: Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Schwimmstrecken in Meter [m]. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten ($n = 18$) und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen ($n = 14$) A: über den gesamten Verlauf des Water-Maze-Versuches ($p = 0,8942$) sowie C: in der Lernphase der versetzten Plattform ($p = 0,8942$). B + D: Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Geschwindigkeiten in [cm/s]. Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschwindigkeiten der infizierten ($n = 18$) und den nicht-infizierten

Tg^{+/-}-Mäusen (n = 14) **B**: über den gesamten Verlauf des Water-Maze-Versuches (p = 0, 5818) sowie **D**: in der Lernphase der versetzten Plattform (p = 0,3327).

Auch bei der Betrachtung der Lernphase mit der versetzten Plattform (Tag 29 bis 31) konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Schwimm-Strecke und -Geschwindigkeit zwischen den Tg^{+/-}-Mäusen beobachtet werden [AUC der Schwimm-Strecke (Meter x Tage): 13,2 (9,2/22) für die infizierten Mäuse vs. 16,3 (10,9/19,9) für die nicht-infizierten Mäuse; p = 0,8942; AUC der Schwimm-Geschwindigkeit (Zentimeter/Sekunden x Tage): 23,9 (16,2/30,6) für die infizierten Mäuse vs. 28,3 (21,1/32,5) für die nicht-infizierten Mäuse; p = 0,3327; siehe Abb. 23].

3.5.2 Einfluss der Infektion auf die Leistungen der Tg^{-/-}- Mäuse

Um zu beweisen, dass der gefundene Unterschied zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäusen nicht alleine auf der Infektion beruhte, sondern auch durch die Transgenität bedingt war, wurde der Morris Water Maze ebenfalls mit den nicht-transgenen Mäusen bis zum Ende durchgeführt.

Bei der Beurteilung der Schwimm-Zeiten der Tg^{-/-}-Mäuse im Water Maze zeigte sich kein signifikanter Unterschied [AUC (Sekunden x Tage): infizierte Mäuse 2040 (771/2710) versus nicht-infizierte Tg^{-/-}-Mäuse: 1264 (640/2631), p = 0,3451]. Vor allem bei der Betrachtung der Phase der versetzten Plattform, wo sich bei den transgenen Mäusen eine signifikante Differenz zeigte, konnte keine signifikante Differenz bei dem Vergleich der infizierten und der nicht-infizierten Tg^{-/-}-Mäuse nachgewiesen werden. Hier zeigte sich ein nahezu gleiches Lernverhalten der infizierten und der nicht-infizierten Tg^{-/-}-Mäuse [AUC Tag 29 bis 31 (Sekunden x Tage): infizierte Tg^{-/-}-Mäuse 163 (62/182) versus nicht-infizierte Tg^{-/-}-Mäuse 139 (61/ 61; p = 0,9079].

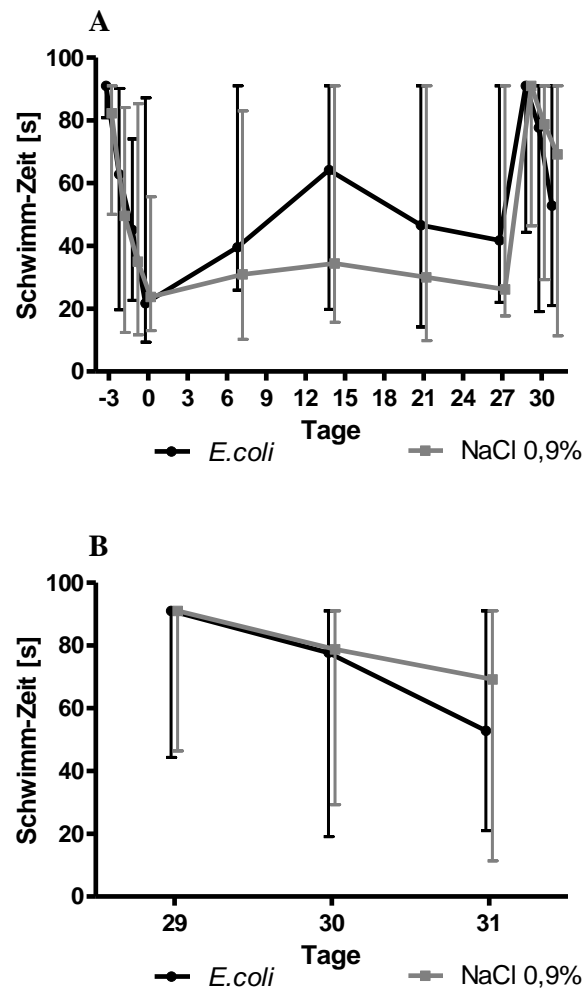


Abb. 24: Vergleich der Schwimm-Zeiten im Morris Water Maze zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Schwimmzeiten in Sekunden [s]. **A:** Gesamter Water-Maze-Versuch. **B:** Versetzte Plattform (Tag 29 bis 31). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten ($n = 15$) und den nicht-infizierten Mäusen ($n = 17$) gefunden werden (**A:** $p = 0,3451$; **B:** $p = 0,9079$).

Auch bei der Betrachtung der Schwimm-Strecke sowie der Schwimm-Geschwindigkeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der infizierten und der nicht-infizierten Gruppe gefunden werden [Schwimm-Strecke: AUC (Meter x Tage): infizierte $Tg^{-/-}$ -Mäuse 175 (109/302) versus nicht-infizierte $Tg^{-/-}$ -Mäuse 135 (101/247); $p = 0,406$; Schwimm-Geschwindigkeit: AUC (Zentimeter/Sekunde x Tage): infizierte $Tg^{-/-}$ -Mäuse 489 (352/673) versus nicht-infizierte $Tg^{-/-}$ -Mäuse 493 (390/617); $p = 0,880$].

Bei der Betrachtung der Lernphase mit der versetzten Plattform konnte hier, wie bei den transgenen Mäusen, ebenfalls kein signifikanter Unterschied beobachtet werden [AUC der

Schwimm-Strecke (Meter x Tage): 9,9 (4,7/14,8) für die infizierten versus 8,7 (5,6/15,3) für die nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,763$; AUC der Schwimm-Geschwindigkeiten (Zentimeter/Sekunden x Tage): 21,7 (16,8/33,6) für die infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäuse versus 23,5 (18,6/29,7) für die transgenen $Tg^{-/-}$ -Mäuse; $p = 0,734$].

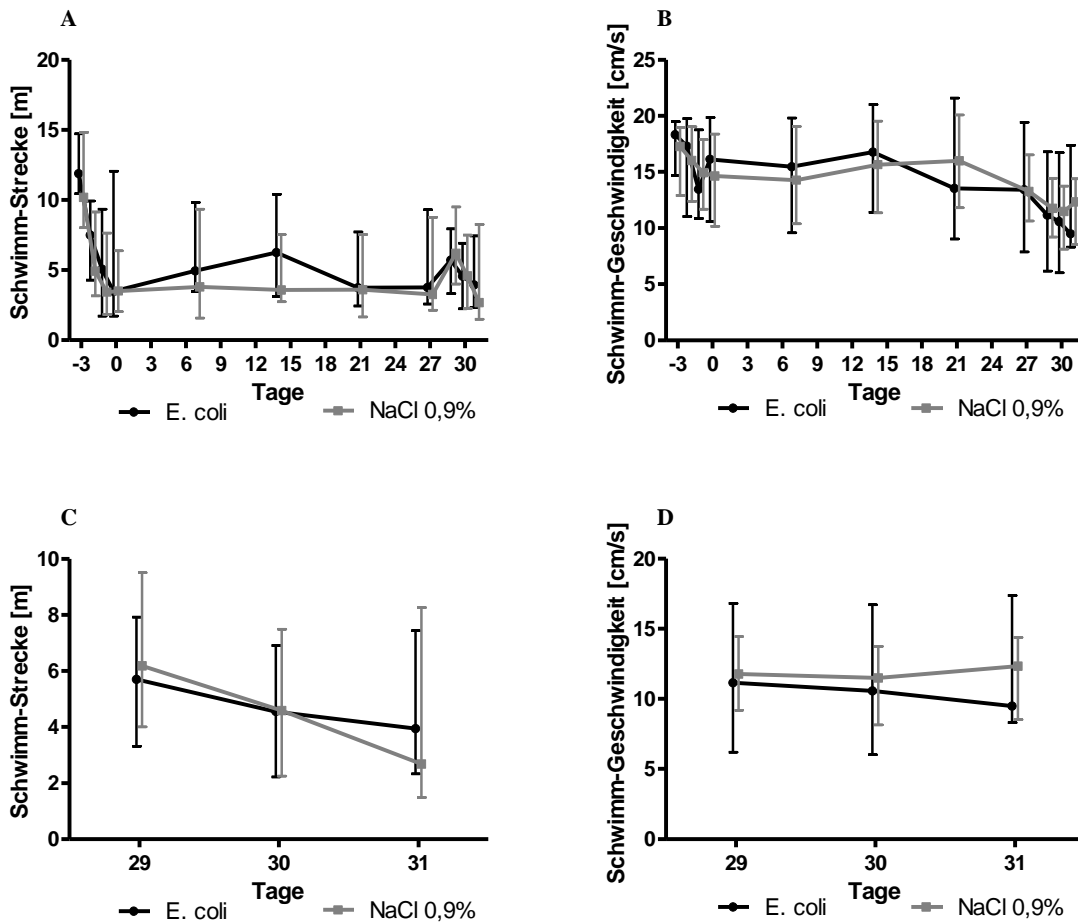


Abb. 25: Vergleich der Schwimm-Strecke und -Geschwindigkeit im Water Maze zwischen den infizierten und den nicht-infizierten $Tg^{-/-}$ -Mäusen. A + B: Gesamter Water-Maze-Versuch. **C + D:** Versetzte Plattform (Tag 29 bis 31). **A + C:** Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Schwimm-Strecke in Meter [m]. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten ($n = 15$) und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen ($n = 17$) **A:** über den gesamten Verlauf des Water-Maze-Versuches ($p = 0,406$) sowie **C:** in der Lernphase der versetzten Plattform ($p = 0,763$). **B + D:** Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Geschwindigkeiten in [cm/s]. Hier zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten ($n = 15$) und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen ($n = 17$) **B:** über den gesamten Verlauf des Water Maze ($p = 0,880$) und **D:** in der Lernphase der versetzten Plattform ($p = 0,734$).

3.5.3 Einfluss der Infektion auf die Tg^{+/-}-Mäuse: Geschlechterdifferenzen

Wie zu Beginn der vorliegenden Arbeit erwähnt, konnten die Versuchsreihen nicht mit einem einheitlichen Geschlecht durchgeführt werden. Sowohl in der transgenen als auch in der nicht-transgenen Gruppe wurden beide Geschlechter verwendet. Das Geschlechterverhältnis am Ende des Versuches kann der Tab. 4 entnommen werden.

	Tg ^{+/-} -Mäuse		Tg ^{-/-} -Mäuse	
	weiblich	männlich	weiblich	Männlich
Infizierte Mäuse	12	6	10	5
Nicht-infizierte Mäuse	9	5	11	6

Tab. 4: Geschlechterverhältnis am Ende des Versuches.

Das Geschlechterverhältnis lag dementsprechend in jeder Gruppe etwa bei 2 : 1 (weiblich : männlich). Bei dem Geschlechter-Vergleich zeigte sich, dass die infizierten weiblichen Tg^{+/-}-Mäuse nach der Infektion und im Verlauf der Lernphase der versetzten Plattform in den neuropsychologischen Tests deutlich schlechter abgeschnitten hatten als die infizierten männlichen Tg^{+/-}-Mäuse. Im Water Maze zeigte sich während der Trainingsphase ein annähernd gleiches Verhalten [AUC Tag -3 bis -1 (Sekunden x Tage): 116,6 (77,8/172,6) für die weiblichen Mäuse versus 109,4 (68,4/154,7) für die männlichen Mäuse; $p = 0,5425$]. Am Tag 0 vor der Infektion zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Weibchen und den Männchen [Mann-Whitney U-Test Tag 0: 48,2 (18,2/91) s für die weiblichen versus 51,71 (10,3/91) s für die männlichen Tg^{+/-}-Tiere; $p = 0,6677$]. Nach der Infektion jedoch verschlechterten sich die Leistungen der weiblichen Tiere, wobei die Leistungen der Männchen konstant blieben bzw. sich sogar verbesserten. Der Vergleich der Leistungen im Water Maze nach der Infektion der Tg^{+/-}-Mäuse zeigte ein signifikant schlechteres Leistungsvermögen der Weibchen gegenüber den männlichen Artgenossen sowohl in der Phase nach der Infektion mit der normalen Lokalisation der Plattform als auch in der Lernphase der neuen Lokalisation [AUC Tag 7 bis Tag 27 (Sekunden x Tage): 1556 (1160/1693) für die weiblichen vs. 597 (408/801) für die männlichen infizierten Tg^{+/-}-Mäuse ($p = 0,0023$); AUC Tag 29 bis Tag 31 (Sekunden x Tage): 180 (157/182) für die weiblichen infizierten Tg^{+/-}-Mäuse vs. 104 (82/167) für die männlichen infizierten Tg^{+/-}-Mäuse; $p = 0,0194$].

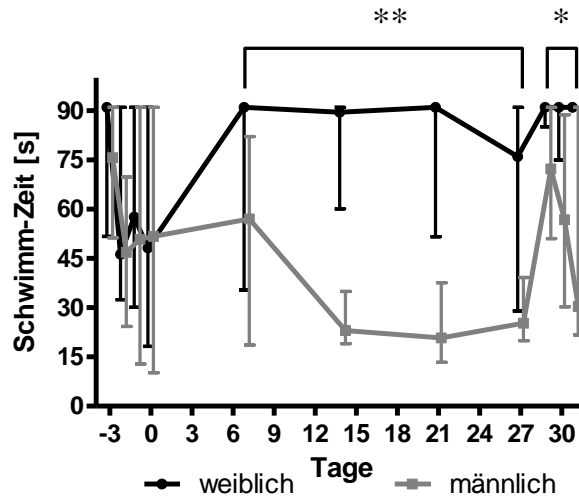


Abb. 26: Water Maze, Schwamm-Zeiten: Vergleich der weiblichen infizierten Tg^{+/-}-Mäuse mit den männlichen infizierten Tg^{+/-}-Mäusen. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Schwimm-Zeiten in Sekunden [s]. Nach der Infektion waren die weiblichen transgenen Mäuse (n = 12) signifikant schlechter im Water Maze als die männlichen transgenen Mäuse (n = 6) (** p < 0,01; * p < 0,05).

Bei den nicht-transgenen Mäusen konnte diese Differenz nicht gefunden werden [AUC Tag 7 bis Tag 31 (Sekunden x Tage): 1123 (542/1902) für die weiblichen infizierten Tg^{-/-}-Mäuse vs. 1583 (927/1583) für die männlichen infizierten Tg^{-/-}-Mäuse; p = 0,422]. Nach der Infektion nahm die Leistung der männlichen Tg^{-/-}-Tiere immer weiter ab. Und am Ende des Versuches waren die Männchen sogar tendenziell schlechter als die Weibchen.

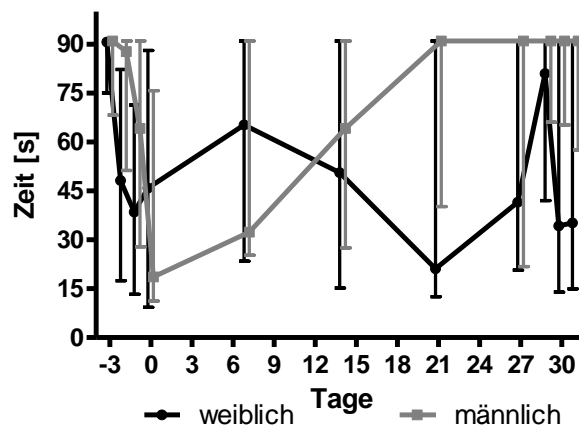


Abb. 27: Water Maze, Schwamm-Zeiten: Vergleich der weiblichen infizierten Tg^{-/-}-Mäuse mit den männlichen infizierten Tg^{-/-}-Mäusen. Dargestellt sind die Mediane und die 25./75. Perzentile der Schwimm-Zeiten in Sekunden [s]. Die weiblichen Tg^{-/-}-Tiere (n = 10) waren nicht signifikant schlechter als die männlichen Tg^{-/-}-Tiere (n = 5; p = 0,422).

Um auszuschließen, dass der gefundene Geschlechterunterschied nicht ausschließlich durch die Transgenität hervorgerufen wurde, sondern durch die Infektion der $Tg^{+/-}$ -Mäuse entstanden war, wurden außerdem die nicht-infizierten weiblichen und männlichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse miteinander verglichen. Hier zeigte sich eine signifikante Differenz der Leistungen bereits während der Trainingsphase. Die weiblichen Mäuse waren hier signifikant schlechter als die männlichen Tiere [AUC der Tage -3 bis -1 (Sekunden x Tage): 172 (118/182) für die weiblichen vs. 76, (55/131) für die männlichen nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse; $p = 0,023$]. Beim Vergleich der letzten drei Versuchstage, in denen die Plattform versetzt wurde, zeigte sich jedoch keine signifikante Differenz [137,4 (99,8/174,2) für die weiblichen versus 107,7 (55,2/117,2) für die männlichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse; $p = 0,142$]. Die weiblichen Tiere waren hier aber auch tendenziell schlechter.

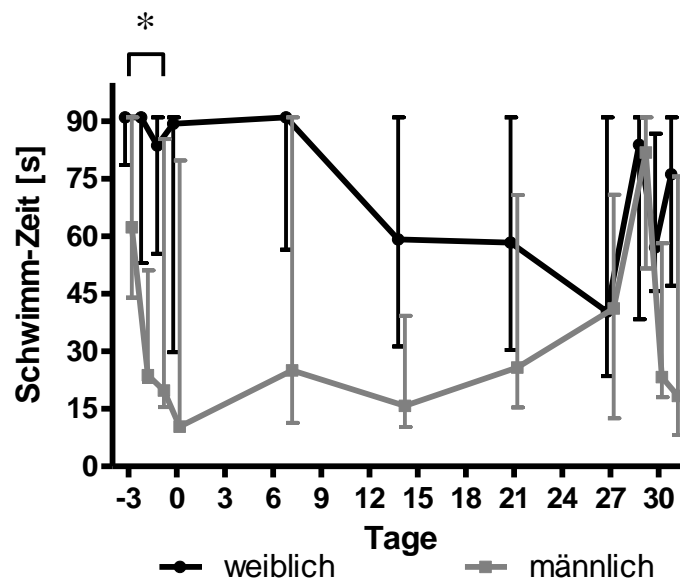


Abb. 28: Water Maze, Schwimm-Zeiten: Vergleich der weiblichen nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse mit den männlichen nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind die Mediane sowie die 25./75. Perzentile der Schwimm-Zeiten in Sekunden [s]. Die weiblichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($n = 9$) waren bereits zu Beginn des Versuches in der Trainingsphase signifikant schlechter als die männlichen $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($n = 5$; * $p = 0,023$). Diese Differenz war bis zum Ende des Versuches tendenziell vorhanden, wobei sich aufgrund der hohen inter- und intraindividuellen Variationen kein signifikanter Unterschied zwischen den weiblichen und den männlichen nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen zeigte (Tage 29 - 31: $p = 0,142$).

3.6 Amyloid-β-Gehalt post infectionem

Nach Versuchsende wurden die Mäuse per Genickbruch getötet und deren Gehirne präpariert. Die linke Hemisphäre wurde für die Untersuchung mit Hilfe des ELISAs verwendet und die rechte für die Untersuchung unter dem Mikroskop. Die Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

3.6.1 ELISA

Die Auswertung des ELISA-Tests erfolgte mit Hilfe des Multiplate Reader der Firma Tecan (Crailsheim). Es wurden die löslichen sowie die unlöslichen Aβ1-40- und Aβ1-42-Peptide gemessen (siehe auch Kapitel 2.7.6, S. 34). Bei der Auswertung konnten keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen der Amyloid-Peptide zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Tg^{+/-}-Mäusen gefunden werden. Einer der Gründe könnte die geringe Anzahl der untersuchten Mäuse sein (infizierte Tg^{+/-}-Mäuse n = 11 versus nicht-infizierte Tg^{+/-}-Mäuse n = 10). Bei der Betrachtung des Verhältnisses zwischen der Konzentration des löslichen Aβ1-42 und der Konzentration des löslichen Aβ1-40 konnte eine leichte Tendenz beobachtet werden. Die infizierten Mäuse wiesen etwas mehr Aβ1-40 als Aβ1-42 auf, wohingegen die nicht-infizierten Mäuse nahezu identische Konzentrationen an Aβ1-40 und Aβ1-42 besaßen. Die infizierten Mäuse wiesen dementsprechend tendenziell einen niedrigeren Aβ1-42/Aβ1-40-Quotienten auf als die nicht-infizierten Mäuse (Aβ1-42/Aβ1-40-Quotient des löslichen Aβ: 0,659 ± 0,170 für die infizierten Mäuse versus 0,937 ± 0,718 für die nicht infizierten Mäuse; p = 0,227) (siehe Tab. 5 und Abb. 29).

Lösliches Aβ [pg/mg Gehirn]			
Aβ	<i>E. coli</i>	NaCl 0,9%	p-Wert
1-40	8,350 ± 2,640	7,227 ± 3,100	0,381
1-42	5,216 ± 1,083	5,333 ± 2,151	0,875
1-42/1-40	0,659 ± 0,170	0,937 ± 0,718	0,227
Unlösliches Aβ [pg/mg Gehirn]			
Aβ	<i>E. coli</i>	NaCl 0,9%	p-Wert
1-40	1,779 ± 0,282	1,715 ± 0,120	0,514
1-42	6,665 ± 1,912	6,228 ± 0,3992	0,488
1-42/1-40	1,335 ± 0,488	1,544 ± 1,112	0,577

Tab. 5: Vergleich der Aβ-Konzentrationen im ELISA-Test

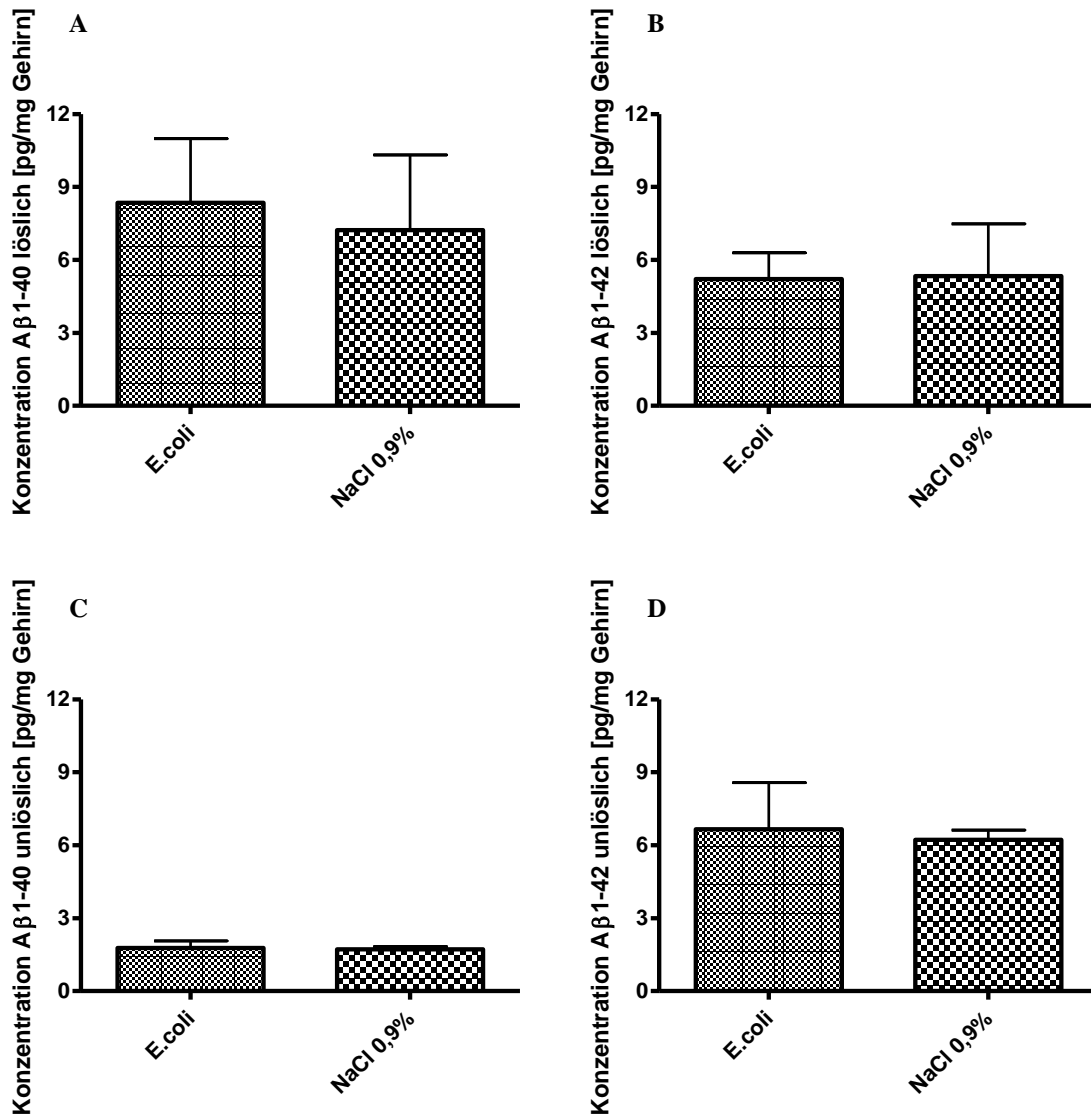


Abb. 29: ELISA: Aβ-Konzentrationsvergleich zwischen den infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Aβ-Konzentrationen und die Standardabweichungen in pg/mg Gehirn. **A:** Vergleich der löslichen Aβ1-40-Komponente ($p = 0,381$). **B:** Vergleich der löslichen Aβ1-42-Komponente ($p = 0,875$). **C:** Vergleich der unlöslichen Aβ1-40-Komponente ($p = 0,514$). **D:** Vergleich der unlöslichen Aβ1-42-Komponente ($p = 0,488$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

3.6.2 Thioflavin-S-Färbung

Die Amyloid-β-Plaques der Mäuse des Stammes Tg2576 wurden mit Hilfe der Thioflavin-S-Färbung dargestellt. Dabei wurde je ein koronarer Schnitt aus der Mitte des Cerebrums jeder Maus angefertigt und mikroskopiert. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Definiens unter Mithilfe von Dr. M. Kreuzfeld aus der Abteilung Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen (siehe auch Kapitel 2.7.5, S. 33).

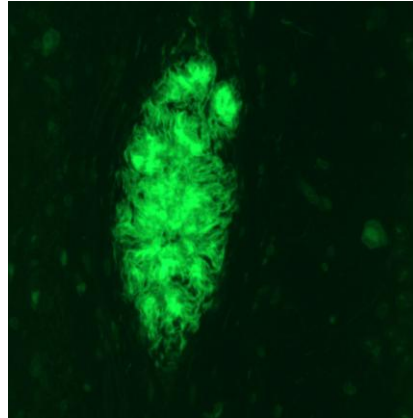


Abb. 30: Thioflavin-S-Färbung, Ausschnitt aus dem Querschnitt des Cerebrums einer $Tg^{+/-}$ -Maus (Maus 5679). Beispiel einer mit Thioflavin-S-gefärbten A β -Plaque.

Bei dem Vergleich zwischen den infizierten transgenen Mäusen mit den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen fiel kein signifikanter Unterschied bei Betrachtung der Thioflavin-positiven Plaque-Fläche auf. Die infizierten transgenen Mäuse wiesen dementsprechend keine signifikant größere oder kleinere Plaque-Fläche auf als die nicht-infizierten [$2,5 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ für die infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse versus $3,3 \times 10^5 \pm 2,5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ für die nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäuse ($p = 0,465$; siehe Abb. 31)].

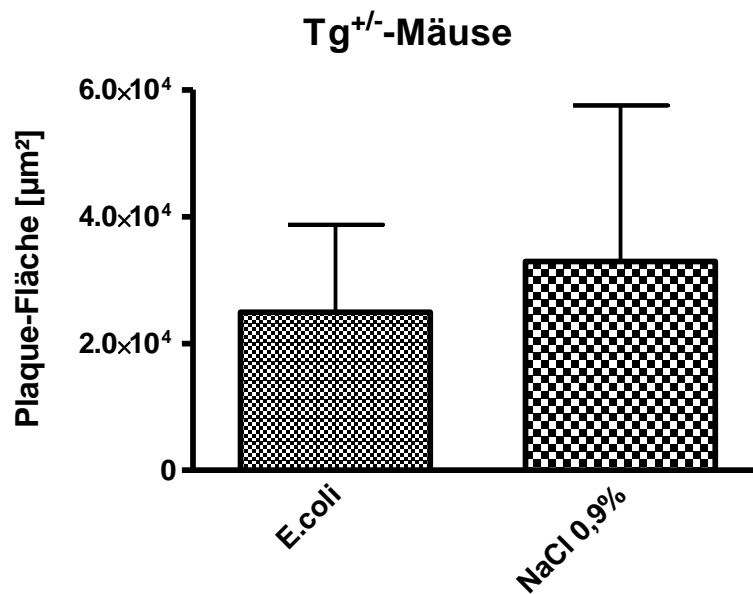


Abb. 31: Analyse der Thioflavin-S-gefärbten Gehirnschnitte der $Tg^{+/-}$ -Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen der Plaque-Flächen in μm^2 . Zwischen den infizierten ($n = 8$) und den nicht-infizierten $Tg^{+/-}$ -Mäusen ($n = 5$) konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Plaque-Fläche gefunden werden ($p = 0,465$).

4 Diskussion

Neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer stellen aufgrund des demographischen Wandels ein immer größer werdendes Problem dar. Doch nicht nur die neurodegenerativen Erkrankungen stellen ein Problem der älteren Generation dar. Auch das Auftreten bakterieller Infekte, wie Harnwegsinfekte oder Lungenentzündungen, werden mit dem Alter häufiger. Aufgrund der klinischen Beobachtung, dass sich bakterielle Infektionen auch negativ auf eine bestehende neurodegenerative Erkrankung auswirken (Holmes et al. 2003; Perry et al. 2007), rückt die Untersuchung dieses Effektes immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung auch im Hinblick auf die möglichen Auswirkungen auf eine adäquate Therapie. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss einer intrazerebralen Infektion mit *Escherichia coli* auf den Verlauf der Alzheimer-Demenz im Mausmodell mit Mäusen des Stammes Tg2576 analysiert. Dabei wurden sowohl infizierte mit nicht-infizierten transgenen Mäusen verglichen als auch transgene mit nicht-transgenen Mäusen. Ziel der Arbeit war es, einen möglichen Einfluss einer bakteriellen Infektion auf die kognitiven Fähigkeiten der transgenen Mäuse zu untersuchen.

4.1 Einfluss der intrazerebralen Infektion mit *E. coli* auf die kognitive Leistungsfähigkeit der transgenen Mäuse des Stammes Tg2576

Die Untersuchung der kognitiven Fähigkeiten wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Morris-Water-Maze-Experimentes durchgeführt. Dabei wurde eine signifikante Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei den infizierten transgenen Mäusen des Stammes Tg2576 nachgewiesen. Diese bezog sich auf das Erlernen neuer Begebenheiten. Den Mäusen gelang es nach der Infektion nicht, eine neue Information zu erlernen.

Das Erinnern hingegen war nicht signifikant beeinträchtigt durch die intrazerebrale Infektion. Infizierte Tg^{+/-}-Mäuse erinnerten sich auch nach der Infektion nicht signifikant schlechter an eine vorher erlernte Lokalisation einer unsichtbaren Plattform im Water-Maze-Experiment als transgene Mäuse, die nicht mit dem Bakterium *E. coli* infiziert wurden.

Durch die Versetzung der Plattform ca. vier Wochen nach der stattgefundenen Infektion wurde das Erlernen neuer Begebenheiten überprüft. Hier zeigte die mit *E. coli* infizierte Gruppe eine signifikant schlechtere Leistungsfähigkeit als die nicht-infizierten transgenen Mäuse. Die kognitiven Leistungsfähigkeiten des Neulernens waren dementsprechend

durch die Infektion eingeschränkt. Den Tieren gelang es nicht, die neue Lokalisation zu erlernen, wohingegen das Lernverhalten der nicht-infizierten transgenen Mäuse dem Lernverhalten zu Beginn der Versuche entsprach. Um zu beweisen, dass diese Verschlechterung der Water-Maze-Ergebnisse nicht aufgrund motorischer Defizite geschah, sondern aufgrund der beeinträchtigten kognitiven Gehirnfunktionen, wurden neben den neuropsychologischen Versuchen auch motorische Tests durchgeführt. Diese motorischen Tests ergaben aber keinerlei Hinweise auf eine beeinträchtigte motorische Leistungsfähigkeit, dementsprechend waren die schlechten Leistungen im Water Maze allein auf die kognitiven Fähigkeiten zurückzuführen.

Um außerdem nachzuweisen, dass die gefundenen Defizite der transgenen infizierten Mäuse auch auf der Transgenität beruhten und nicht alleine Resultat der Infektion mit *E. coli* waren, wurden außerdem nicht-transgene Mäuse des Stammes Tg2576 infiziert. Bei der Untersuchung der nicht-transgenen Mäuse konnte kein signifikanter Unterschied der kognitiven Leistungen zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Mäuse beobachtet werden. Dadurch kann angenommen werden, dass eine Infektion sich nicht auf die kognitiven Leistungen von nicht-transgenen Mäusen auswirkt.

Die Zusammenführung dieser beiden Beobachtungen lässt annehmen, dass sich eine intrazerebrale Infektion mit dem Bakterium *E. coli* nur auf die kognitiven Leistungen der transgenen, nicht aber auf die der nicht-transgenen Mäuse des Stammes Tg2576 auswirkt. Diese Erkenntnis und die Entdeckung, dass sich die Infektion nur auf die Verschlechterung des Neu-Erlernens beziehen, stellt eine wichtige Beobachtung dar. Bei der AD kommt es sehr häufig zu Problemen bei der Aufnahme neuer Informationen. Viele Patienten leiden unter dem Verlust kognitiver Fähigkeiten im Sinne von Wissen um die aktuelle Situation. Das semantische Gedächtnis sowie ältere Inhalte des episodischen Gedächtnisses bleiben initial oft unbeeinträchtigt. Dementsprechend könnte hier die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die dementielle Symptomatik in Mäusen infolge einer intrazerebralen Infektion fortschreitet. Zu Beginn des Experimentes zeigte sich kein Unterschied in dem Lernverhalten der Gruppen. Nach der Infektion konnte jedoch ein deutlicher Unterschied beim Erlernen der neuen Lokalisation der Plattform beobachtet werden. Durch die Definition der Demenz als eines Verlustes früher vorhandener geistiger Leistungsfähigkeit (Bandelow et al. 2008) kann hier angenommen werden, dass bei den Mäusen ein dementielles Problem vorlag, was dem von AD-Patienten ähnelt. Dieser Zusammenhang und die Progression der dementiellen Symptomatik durch die Infektion lassen darauf schließen,

dass das Vorbeugen von Infektion bei älteren Menschen sehr wichtig ist. Ältere Menschen leiden sehr viel häufiger unter banalen Infekten als jüngere Menschen. Wenige klinisch-retrospektive Untersuchungen konnten bereits einen negativen Einfluss dieser Infektionen auf eine bestehende neurodegenerative Erkrankung nachweisen. Holmes et al. konnten feststellen, dass systemische Infektionen die kognitiven Fähigkeiten von AD-Patienten verschlechtern können und dass systemische Infektionen die kognitiven Fähigkeiten auch zwei Monate später noch beeinträchtigen (Holmes et al. 2003). In tierexperimentellen Versuchen mit nicht-transgenen Tieren konnte weiterhin gezeigt werden, dass hohe unphysiologische Dosen LPS, eines bakteriellen Wandbestandteils, sowohl intrazerebral (Hauss-Wegrzyniak et al. 1998) als auch intraperitoneal (Lee et al. 2008) verabreicht, zu einer akuten Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten führen. Diese Beobachtung konnte auch in Tiermodellen mit transgenen Mäusen beobachtet werden und soll später näher erläutert werden. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gelang es nun, erstmalig eine langfristige kognitive Verschlechterung einer bestehenden neurodegenerativen Erkrankung durch eine echte Infektion auch anhand eines tierexperimentellen Versuches zu belegen.

Wellmer et al. konnten bereits eine solche Verschlechterung im Water Maze bei nicht-transgenen Mäusen nachweisen, die mit dem grampositiven Bakterium *Streptococcus pneumoniae*, des häufigsten Erregers von Lungenentzündungen und Meningitiden, intrazerebral infiziert wurden (Wellmer et al. 2000). Dort zeigten die Mäuse sowohl innerhalb der ersten Woche nach der Infektion als auch in der späteren Lernphase eine Verschlechterung der Leistungen im Water-Maze-Labyrinth. Eine Verschlechterung der kognitiven Funktionen konnte jedoch bei den nicht-transgenen Mäusen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. Dies könnte an der niedrigeren Virulenz des Bakteriums *E. coli* K1 gegenüber der hohen Virulenz des Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* liegen. Trotz der intrazerebralen Injektion des *E. coli* mit einer Konzentration von 6×10^3 CFU pro Maus zeigten die Mäuse zu Beginn der Infektion sogar kaum klinische Zeichen einer ausgeprägten Meningitis, sodass mit dem Beginn der Antibiose lange gewartet werden konnte. Dadurch waren die Mäuse einer sehr viel längeren Zeit dem Bakterium ausgesetzt. Dennoch hatte die Infektion keinerlei Auswirkungen auf die nicht-transgenen Mäuse. Doch auch die transgenen Mäuse zeigten kurz nach der Infektion keine Verschlechterungen der kognitiven Leistungen.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit stellte jedoch auch nicht die akute Meningitis mit ihren Auswirkungen dar, sondern die chronische Reizung durch das Bakterium bzw. seiner Zellwand-Bestandteile. Dabei war es sehr wichtig, dass die Erreger eine ausreichend lange Zeit im Körper der Tiere verweilten, damit das Gehirn eine möglichst lange Zeit dem LPS und den anderen proinflammatorischen Bestandteilen der Bakterien ausgesetzt war. Aus diesem Grund wurde die Infektion intrazerebral vorgenommen, da eine systemische Infektion mit *E. coli* in hohen Dosen zu einer sehr hohen und raschen Mortalität führt.

Die Versuche, die der vorgelegten Arbeit vorangingen, wurden mit dem Bakterium *Streptococcus pneumoniae* durchgeführt. Diese Experimente konnten jedoch keine langfristige Verschlechterung kognitiver Leistungen sowohl bei einer systemischen Infektion (Ebert et al. 2010), als auch bei einer intrazerebralen Infektion mit dem Bakterium (bisher noch unpublizierte Daten) bei transgenen Mäusen nachweisen. Dies könnte an dem Aufbau der Studien liegen. Dabei handelte es sich jeweils um eine starke Infektion mit einem grampositiven Erreger, wohingegen in der vorgelegten Arbeit der gramnegative Erreger *E. coli* eingesetzt wurde, der im Unterschied zum Pneumokokkus LPS als Wandbestandteil besitzt. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte in vergangenen Studien gezeigt werden, dass bereits die alleinige Applikation von unphysiologisch hohen Dosen LPS ausreicht, um die Progredienz einer bestehenden neurodegenerativen Erkrankung zu beschleunigen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine systemische Gabe des LPS im Mausmodell der Prionerkrankung zu einer schnelleren Entwicklung motorischer Defizite führt (Combrinck et al. 2002). Auch in einem Modell der Amyotrophen Lateralsklerose konnte ein negativer Einfluss auf den Progress der neurodegenerativen Erkrankung durch systemische LPS-Applikation nachgewiesen werden (Nguyen et al. 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LPS vor allem auf die Funktion der Mikrogliazellen bei in-vitro-Versuchen große Auswirkungen hat, indem es diese zur Phagozytose stimuliert sowie zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Stickstoffmonoxid und Zytokinen führt, was einen neuronalen Zelluntergang verursacht (Boje und Arora 1992; Chao et al. 1992; Ebert et al. 2005; Lehnardt et al. 2003; Schütze et al. 2012). Neuere in-vitro-Experimente konnten weiterhin zeigen, dass der neuronale Zelltod vor allem durch die Phagozytose von Neuronen durch die aktivierten Mikrogliazellen verursacht wird und dass das Endotoxin LPS und das A β , welches bei der AD vorkommt, die Mikrogliazellen additiv aktivieren können (Schütze et al. 2012). Diese additive Aktivierung der Mikrogliazellen ist mit den Ergebnissen aus den in-vivo-Versuchen, die ein Fortschreiten neurodegenerativer Erkrankungen durch die systemische Gabe eines bakteriellen

Endotoxins zeigen, gut vereinbar. Diese beiden Ergebnisse verdeutlichen die überschießende proinflammatorische Antwort, die von den voraktivierten Mikrogliazellen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen auftreten, auf ein bakterielles Endotoxin entsteht, wodurch es zu einem Progress der neurodegenerativen Erkrankungen kommen kann (Combrinck et al. 2002; Cunningham et al. 2005; Cunningham et al. 2009; Cunningham 2012; Herber et al. 2007; Morgan et al. 2005). LPS wird freigesetzt, wenn die gramnegativen Bakterien zerfallen. Dies geschieht in großer Anzahl durch die Gabe eines Antibiotikums, welches in die Zellwand-Synthese eingreift. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein solches Antibiotikum verwendet. Dadurch kommt es zu Beginn der antibiotischen Therapie noch einmal zu einem erheblichen Anstieg der Konzentration an LPS. Dies führt zu einer erneuten Reizung der Meningen und des Gehirns. Besonders anfällig scheint in diesem Zusammenhang der Hippokampus zu sein. Seine Blutversorgung ist schlechter als die anderer Gehirnareale. Hier findet vor allem bei der AD eine deutliche Degeneration statt, die für die klinische Symptomatik der Patienten verantwortlich gemacht wird, da ein hippokampaler Zellverlust zu einer Beeinträchtigung des Gedächtnisses führt (Jarrard 1993; Scoville und Milner 1957). Diese Hippokampus-Atrophie führt zu einer starken Vergesslichkeit und zu Einschränkungen der räumlichen Orientierungsfähigkeit. Dieser Zusammenhang konnte auch in Tierexperimenten nachgewiesen werden, in denen Ratten mit hippokampalen Läsionen unter einer Beeinträchtigung der räumlichen Orientierung litten (Morris et al. 1982). Des Weiteren fällt es AD-Patienten sehr schwer, neue Aufgaben zu erlernen. Diese Störung konnte mit dem Experiment der vorliegenden Arbeit auch im Mausmodell dargestellt werden. Im Vergleich der infizierten transgenen Mäuse, die das Gen für die AD trugen, zu den nicht-infizierten transgenen Mäusen zeigte sich ein deutliches Defizit im Erlernen neuer Gegebenheiten. Nicht das Erinnern an alte Gegebenheiten fiel ihnen schwer, sondern neue Dinge zu begreifen. Exakt diese Beobachtung lässt sich ebenfalls bei AD-Patienten beobachten. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass eine Infektion mit einem gramnegativen Bakterium und die anschließende Behandlung der Infektion mit einem in die Zellwand eingreifenden Antibiotikum und die dadurch freigesetzte große Menge an LPS und anderen proinflammatorischen Bestandteilen zu einer Verschlechterung der AD-Symptomatik führt. Wichtig ist daher der möglichst schnelle Beginn einer antibiotischen Therapie, um die Vermehrung der Bakterien zu verhindern. Dementsprechend ist vor allem die lange Latenz zwischen Infektion und Beginn der Antibiose ausschlaggebend für den Verlauf der Erkrankung. In der vorliegenden Dissertation wurde nach 41 Stunden die

Antibiose gestartet. In dieser Zeit vermehrten sich die Bakterien von anfangs 3,5 log CFU/ml auf über 6 log CFU/ml. Die Frage, die sich stellt, ist also, ob die Verschlechterung der kognitiven Leistungen durch eine frühzeitigere Behandlung der Meningitis hätte verhindert werden können. Wenn weniger Bakterien vorliegen, kann folglich weniger LPS freigesetzt werden. Dementsprechend sollten bakterielle Infektionen, insbesondere bakterielle Meningitiden frühzeitig aggressiv therapiert werden, damit Langzeitschäden verhindert werden (Lotz et al. 2005). Des Weiteren wird diskutiert, ob die Wahl des Antibiotikums auch eine Rolle spielen könnte. Die Idee ist, ein Antibiotikum einzusetzen, welches weniger stark LPS oder andere proinflammatorische bakterielle Zellwandbestandteile freisetzt (Lotz et al. 2005), wie zum Beispiel das Antibiotikum Rifampicin (Nau et al. 1999b; Stuertz et al. 1998), welches inhibitorisch auf die RNA-Polymerase wirkt (Ovchinnikov et al. 1983). Als erfolgsversprechend werden dabei bakterizide Antibiotika angesehen, die wie das Rifampicin die Protein-Synthese der Bakterien inhibieren und nicht in die Zellwand-Synthese eingreifen und demnach nicht bakteriolytisch wirken (Nau und Eiffert 2002; Spreer et al. 2003). Verschiedene Studien konnten dadurch eine geringere Letalität bzw. einen geringeren Nervenzellverlust zeigen (Azeh et al. 2002; Bottcher et al. 2000; Bottcher et al. 2004; Gerber et al. 2003; Nau et al. 1999b). Problematisch ist jedoch die schnelle Resistenzentwicklung der Bakterien gegenüber Rifampicin (Lüllmann et al. 2010), sodass gerade für das Bakterium *E. coli* auf andere Nicht- β -Laktam-Antibiotika zurückgegriffen werden muss, wie beispielsweise auf das Tigecyclin, welches bakteriostatisch durch die Bindung an die Ribosomen wirkt (Livermore 2005). Eine weitere Idee ist die Anwendung antiinflammatorischer Substanzen wie Dexamethason bei der Behandlung bakterieller Meningitiden. Wie oben erwähnt ist dieser Einsatz jedoch weiterhin umstritten (Nau et al. 1999b). Auch die Einnahme nichtsteroidaler Antirheumatika (Bamberger und Landreth 2001; McGeer et al. 1996) oder die Behandlung mit Anti-Tumornekrose-Faktor α wirkte sich protektiv auf die Entwicklung einer AD aus (Cunningham 2012).

Ein weiterer Aspekt, der in der vorliegenden Arbeit behandelt wurde, sind die histopathologischen Veränderungen der Amyloid- β -Plaques, die in Gehirnen von AD-Patienten und den Tg2576-Mäusen angetroffen werden können. Viele Studien konnten zeigen, dass der A β -Gehalt weder mit dem Schweregrad der Demenz (Westerman et al. 2002), noch mit der Inflammation (Quinn et al. 2003) korreliert. Unsere Ergebnisse konnten diese Hypothese bestätigen. Bei der Untersuchung der A β -Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit wurden die A β 1-40- und die A β 1-42-Konzentrationen sowie die

Plaque-Flächen zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Mäusen verglichen. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet. Die Infektion führte zu keiner signifikanten Erhöhung oder Erniedrigung der A β -Konzentration im Gehirn der Mäuse im Vergleich zu den nicht-infizierten Mäusen. Aufgrund dieser Beobachtung und der oben gezeigten Verschlechterung der Demenz im Mausmodell unterstützt diese Arbeit die Hypothese, dass die Schwere der kognitiven Beeinträchtigung nicht mit der A β -Konzentration korreliert ist und dass eine Infektion die Amyloid-Konzentration langfristig nicht erhöht oder erniedrigt. Dies wurde auch bei Versuchen mit rezidivierenden intraperitonealen Injektionen des Pneumokokkus beobachtet (Ebert et al. 2010). Dennoch konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass das A β ein endogener Stimulator für das körpereigene Immunsystem ist (Bamberger et al. 2003; Lotz et al. 2005; Sondag und Combs 2004; Verdier et al. 2004) und die Mikrogliazellen aktiviert, sodass es zur Schädigung von Nervenzellen kommt (Lukiw und Bazan 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine systemische Applikation von LPS zu einer vermehrten intrazellulären A β -Ablagerung führt (Sheng et al. 2003). Andere Studien hingegen konnten eher eine Verringerung der Ablagerung nach einer intraperitonealen LPS-Gabe beobachten (Quinn et al. 2003). Auch bei einer intrazerebralen Applizierung des Endotoxins existieren unterschiedliche Studienergebnisse. Qiao et al. konnten eine vermehrte A β -Ablagerung durch eine intrazerebrale Gabe zeigen (Qiao et al. 2001), wohingegen DiCarlo et al. dies nicht zeigen konnten (DiCarlo et al. 2001). Jedoch konnte beobachtet werden, dass sich die lösliche Komponente des A β durch eine intrazerebrale LPS-Injektion eher vermindert (DiCarlo et al. 2001; Herber et al. 2004). Ein Erklärungsansatz liegt in der Aktivität der Mikrogliazellen, die in der Lage sind, das A β zu phagozytieren (Itagaki et al. 1989; Morgan et al. 2005). Dadurch können sich sowohl die freie Konzentration als auch die Plaques vermindern. Dementsprechend haben die Mikrogliazellen bei neurodegenerativen Erkrankungen sowohl eine nützliche Rolle, indem sie das schädliche A β eliminieren, als auch eine schädliche Rolle, indem sie Neurone schädigen (Cunningham 2012). Weiterhin besteht die Hypothese, dass nur eine akute Inflammation die A β -Ablagerung reduziert, wohingegen eine chronische Stimulation die Ablagerung eher erhöht (Morgan et al. 2005).

Insgesamt ist festzuhalten, dass es bezüglich der Plaque-Zunahme bzw. -Abnahme keine einheitlichen Daten gibt. Ein weiterer Erklärungsansatz deutet auf eine Dysfunktion der Mikrogliazellen hin, die nicht mehr in der Lage sind, das anfallende A β abzubauen, wodurch es zu einer verstärkten Ablagerung kommt (Streit 2004). Die Diskrepanz

zwischen den Studien verdeutlicht, dass die Dichte der Plaques nicht mit der dementiellen Symptomatik korreliert ist. Dies konnte bei den Versuchen der vorgelegten Arbeit ebenfalls gezeigt werden. Trotz kognitiver Verschlechterungen der transgenen Mäuse nach einer bakteriellen Infektion zeigte sich weder eine Plaque-Zunahme noch eine Plaque-Abnahme.

4.2 Einfluss des Geschlechtes auf die Auswirkung einer *E. coli*-Meningitis bei den transgenen Mäusen des Stammes Tg2576

Für tierexperimentelle Untersuchungen wird in den meisten Fällen auf eine phänotypische Gleichwertigkeit der Versuchstiere geachtet. Dabei wird speziell auf ein annähernd gleiches Alter, eine homogene Farbe und ein identisches Geschlecht Wert gelegt. Bei den Tg2576-Mäusen wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet, da diese Mäuse durch ihre lange Haltungsdauer bis zum Erreichen des für die Versuche optimalen Alters von ca. 13 Monaten eine lange Zeit den Einflüssen der ZTE ausgesetzt waren. Um dennoch eine ausreichend große Stichprobe zu bekommen, konnte hier nur auf eine annähernde Gleichverteilung des Alters und des Geschlechtes geachtet werden. Dementsprechend gab es sowohl männliche als auch weibliche Versuchstiere. Während der Hypothesen-überprüfenden Analyse der Ergebnisse der vorgelegten Dissertation stellte sich die Frage, ob das Geschlecht einen interagierenden Effekt auf die Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten hatte. Bei der Hypothesen-bildenden Analyse fiel ein deutlicher geschlechtsspezifischer Unterschied unter den transgenen Mäusen auf. Der Einfluss der intrazerebralen Infektion auf die kognitiven Fähigkeiten der Mäuse war bei den weiblichen Tieren signifikant stärker als bei den männlichen Artgenossen. Hier zeigte sich nicht nur eine Differenz im Erlernen neuer Aspekte, sondern auch im Erinnern bereits erlernter Begebenheiten. Die Beeinträchtigung des episodischen Gedächtnisses beim Patienten mit einer Demenz vom Alzheimer-Typ erfolgt erst sehr viel später im Verlauf der Erkrankung. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Infektion die kognitiven Fähigkeiten der weiblichen Tiere stärker beeinflusst hatte, als die der männlichen Tiere. Das Lernverhalten zu Beginn des Versuches war unter beiden Geschlechtern nicht signifikant unterschiedlich. Nach der Infektion zeigten die männlichen Tiere jedoch weder eine Verschlechterung beim Erinnern alter Informationen, noch eine starke Einschränkung beim Erlernen neuer Begebenheiten. Dementsprechend wirkte sich die Infektion nicht signifikant negativ auf die männlichen Versuchstiere aus. Im Gegensatz dazu hatten die weiblichen Mäuse erhebliche kognitive Verschlechterungen in beiden Aufgaben.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass Patientinnen bei der AD stärker betroffen sind als Patienten (Breitner 2006; Fratiglioni et al. 2000; Rocca et al. 1986). Dies könnte an der längeren Überlebenszeit der weiblichen Bevölkerung liegen, da die AD vor allem bei älteren Patienten auftritt und somit nur bedingt für die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit verwendet werden kann, da in den Versuchen alle Versuchstiere ein äquivalentes Alter besaßen.

Ein weiterer Grund für das stärkere Betroffensein der weiblichen Bevölkerung könnte an hormonellen Einflüssen liegen. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass sich ein erniedrigter Östrogenspiegel, wie er postmenopausal auftritt, negativ auf die Entwicklung einer AD bei der weiblichen Bevölkerung auswirkt (Carroll et al. 2007; Paganini-Hill und Henderson 1994; Tang et al. 1996). Es zeigte sich außerdem, dass eine medikamentöse Therapie postmenopausal das erhöhte Risiko für die Entwicklung einer AD senken kann. Dieser Einfluss konnte jedoch auch bei der männlichen Bevölkerung beobachtet werden. Ein erniedrigter Androgen-Spiegel geht ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer AD bei den männlichen Patienten einher (Pike et al. 2006; Rosario und Pike 2008) und auch hier kann sich eine medikamentöse Hormontherapie positiv auswirken. Dementsprechend zeigen sich sowohl in der weiblichen als auch in der männlichen Bevölkerung deutliche Auswirkungen einer fallenden Hormonkonzentration im Alter.

In mehreren Studien konnte weiterhin belegt werden, dass männliche im Vergleich zu weiblichen Personen eine höhere Suszeptibilität gegenüber Infektionen aufweisen (Klein 2000; Zuk und McKean 1996). Männliche Individuen scheinen einen niedrigeren Immunglobulinspiegel zu besitzen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Frauen eine höhere Anzahl von Antikörpern aufweisen, die auf das Bakterium *E. coli* ansprechen (Schuurs und Verheul 1990). Dementsprechend scheinen weibliche Personen ein wesentlich stärkeres Immunsystem aufzuweisen. Diese verstärkte Immunantwort auf exogene Antigene konnte auch in Tiermodellen beobachtet werden (Eidinger und Garrett 1972). Des Weiteren konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass LPS zu einer polyklonalen Stimulation der körpereigenen B-Lymphozyten führt, welche mit einer verstärkten Sekretion von Immunglobulinen einhergeht (Granholm und Cavallo 1992; Hang et al. 1983; Kearney und Lawton 1975). Außerdem konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass LPS eine Autoimmunerkrankung durch die Aktivierung polyklonaler B-Zellen, und der damit verbundenen Immunglobulin-Synthese, sowohl verstärken als auch induzieren kann (Hang et al. 1983). Dies liegt unter anderem daran, dass bestimmte Zellen

durch Immunglobuline aktiviert werden können, was beispielsweise zu den oben erwähnten voraktivierten Mikrogliazellen im ZNS von AD-Patienten führt (Akiyama 1994). In Anbetracht dessen, dass Immunglobuline unter anderen Faktoren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu spielen scheinen (Granholm und Cavallo 1992), könnte hier die Verbindung hergestellt werden, dass die Höhe des Immunglobulinspiegels mit dem Auftreten autoimmuner Erkrankungen korreliert ist. Hierzu würde auch die ungleiche Verteilung der Autoimmunerkrankungen passen. Frauen leiden wesentlich häufiger unter Erkrankungen wie Multipler Sklerose oder Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis (Olsen und Kovacs 1996; Schuurs und Verheul 1990). Dies könnte zum einen am erwähnten Immunglobulinspiegel liegen, andererseits wird aber auch hier die Anwesenheit der geschlechtsspezifischen Hormone als wichtiger Faktor diskutiert. Im Gegensatz zu den hormonellen Einflüssen, die bei der AD auftreten, scheinen sie bei Immunantworten gegensätzlich zueinander zu wirken. Androgene schwächen eher die Immunantwort, wohingegen Östrogene diese eher noch verstärken (Schuurs und Verheul 1990). Dies wiederum kann den Beobachtungen gegenübergestellt werden, dass sowohl eine Erniedrigung des Androgen- als auch des Östrogenspiegels eine Verschlechterung einer AD hervorruft. Somit existiert ein starker geschlechtsspezifischer Unterschied bei der Immunantwort auf verschiedene Stimuli.

Dieser geschlechtsspezifische Einfluss zeigte sich auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit. Weibliche Tiere waren kognitiv signifikant stärker von einer bakteriellen Infektion beeinträchtigt als die männlichen Mäuse. Diese stärkere Beeinträchtigung könnte durch das Vorhandensein eines stärkeren weiblichen Immunsystems mitbestimmt sein. Wie bereits oben erwähnt spielen bei den neurodegenerativen Erkrankungen vor allem die voraktivierten Mikrogliazellen eine entscheidende Rolle für den Verlauf der Erkrankungen (Holmes et al. 2003). Durch das stärkere Immunsystem der Weibchen könnten diese Mikrogliazellen noch stärker auf eine bakterielle Infektion reagieren als dies bei den Männchen der Fall war. Die überschießende Reaktion könnte dementsprechend noch stärker sein und somit zu einem größeren Nervenzelluntergang führen. Dieser Nervenzelluntergang führt zu den kognitiven Defiziten, wie sie im Versuch beobachtet werden konnten. Die männlichen Tiere, die den Theorien folgend ein schwächeres Immunsystem aufweisen, hätten demnach einen niedrigeren Neuronenverlust und dementsprechend nur leichte kognitive Nachteile. Diese Beobachtung der geschlechtsspezifischen Unterschiede und der bereits erwähnte Aspekt der protektiven Funktion anti-inflammatorischer Medikamente in Bezug auf die Entwicklung einer AD verdeutlichen den Einfluss der

inflammatorischen Komponenten, die bei den neurodegenerativen Erkrankungen gefunden werden können.

5 Zusammenfassung

Bakterielle Infekte führen bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD oft zu einer Verschlechterung der bestehenden Symptomatik. Nicht nur die akuten Auswirkungen im Sinne eines Delirs, sondern auch die Spätfolgen solcher Infekte konnten in klinisch-prospektiven Studien gezeigt werden. Aus diesem Grund ist die Reduzierung dieser negativen Folgen bakterieller Infektionen bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer gerade vor dem Hintergrund des demographischen Wandels von besonderer Bedeutung.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte diese klinische Beobachtung auch in einem tierexperimentellen Versuch nachgewiesen werden. Erstmals gelang es mit einer echten Infektion, eine langfristige Verschlechterung einer neurodegenerativen Erkrankung hervorzurufen. Es wurden Mäuse des Stammes Tg2576 intrazerebral mit *Escherichia coli* infiziert und anhand des neuropsychologischen Testverfahrens Morris Water Maze auf ihre kognitive Leistungsfähigkeit hin untersucht. Dabei fiel eine signifikante Verschlechterung der kognitiven Leistungen der infizierten transgenen Mäuse auf, die sich auf die Funktion des Neu-Erlernens bezogen. Im Gegensatz dazu wiesen Mäuse, die nicht infiziert wurden, eine solche Verschlechterung nicht auf. Den infizierten transgenen Mäusen gelang es vier Wochen nach einer intrazerebralen Infektion nicht, die neue Lokalisation einer Plattform im Morris Water Maze zu erlernen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass sich Infektionen nicht nur akut negativ auf neurodegenerative Erkrankungen auswirken, sondern auch langfristig zu einer Progression der Krankheit führen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten daraufhin, dass eine adäquate, rasche und aggressive antibiotische Behandlung einer bakteriellen Infektion besonders bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen von Vorteil sein könnte. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob sich mit der Wahl des Antibiotikums ebenfalls die negativen Folgen einer Infektion reduzieren lassen. Die Idee ist, ein Medikament einzusetzen, welches nicht in die Zellwand-Synthese eingreift, sondern auf anderem Weg bakterizid wirkt, um die negativen Auswirkungen der bakteriellen Produkte auf den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen zu reduzieren.

6 Literaturverzeichnis

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

Aloisi F (2001): Immune function of microglia. *Glia* 36, 165-179

Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* 64, 146-148

Amor S, Puentes F, Baker D, van d, V (2010): Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology* 129, 154-169

Azeh I, Gerber J, Wellmer A, Wellhausen M, Koenig B, Eiffert H, Nau R (2002): Protein synthesis inhibiting clindamycin improves outcome in a mouse model of *Staphylococcus aureus* sepsis compared with the cell wall active ceftriaxone. *Crit Care Med* 30, 1560-1564

Bamberger ME, Landreth GE (2001): Microglial interaction with beta-amyloid: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 54, 59-70

Bamberger ME, Harris ME, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE (2003): A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci* 23, 2665-2674

Bandelow B, Gruber O, Falkai P: *Kurzlehrbuch Psychiatrie*. 1. Auflage; Steinkopff Verlag, Darmstadt 2008

Barrientos RM, Higgins EA, Biedenkapp JC, Sprunger DB, Wright-Hardesty KJ, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF (2006): Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiol Aging* 27, 723-732

Bayer TA, Wirths O (2008): Paradigmenwechsel bei der Alzheimer-Krankheit: Intrazelluläre Aggregation von Amyloid-beta verursacht den Zellverlust unabhängig von extrazellulären Plaques. *J Neurol Neurochir Psychiatr* 9, 28-31

Block ML, Hong JS (2005): Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* 76, 77-98

Boje KM, Arora PK (1992): Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Res* 587, 250-256

Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA (1987): A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 317, 653-658

Bottcher T, Gerber J, Wellmer A, Smirnov AV, Fakhrjanali F, Mix E, Pilz J, Zettl UK, Nau R (2000): Rifampin reduces production of reactive oxygen species of cerebrospinal fluid phagocytes and hippocampal neuronal apoptosis in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis* 181, 2095-2098

Bottcher T, Ren H, Goigny M, Gerber J, Lykkesfeldt J, Kuhnt U, Lotz M, Bunkowski S, Werner C, Schau I, Spreer A, Christen S, Nau R (2004): Clindamycin is neuroprotective in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis compared with ceftriaxone. *J Neurochem* 91, 1450-1460

Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI (1999): Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5, 298-302

Breitner JC (2006): Dementia--epidemiological considerations, nomenclature, and a tacit consensus definition. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 19, 129-136

Buckner RL, Snyder AZ, Shannon BJ, LaRossa G, Sachs R, Fotenos AF, Sheline YI, Klunk WE, Mathis CA, Morris JC, Mintun MA (2005): Molecular, structural, and functional characterization of Alzheimer's disease: evidence for a relationship between default activity, amyloid, and memory. *J Neurosci* 25, 7709-7717

Carpenter RR, Petersdorf RG (1962): The clinical spectrum of bacterial meningitis. *Am J Med* 33, 262-275

Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ (2007): Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *J Neurosci* 27, 13357-13365

Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK (1992): Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol* 149, 2736-2741

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J (1991): Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353, 844-846

Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Ascherio A (2005): Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 58, 963-967

Choo IH, Lee DY, Kim JW, Seo EH, Lee DS, Kim YK, Kim SG, Park SY, Woo JI, Yoon EJ (2011): Relationship of Amyloid-Beta Burden With Age-At-Onset in Alzheimer Disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 19, 627-634

Combrinck MI, Perry VH, Cunningham C (2002): Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* 112, 7-11

Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS (1998): Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* 51, 2-17

Cunningham C (2012): Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* 61, 71-90

Cunningham C, Wilcockson DC, Champion S, Lunnon K, Perry VH (2005): Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* 25, 9275-9284

Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JF, Deacon RM, Rawlins JN, Perry VH (2009): Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry* 65, 304-312

Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006): Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci* 26, 6011-6018

DiCarlo G, Wilcock D, Henderson D, Gordon M, Morgan D (2001): Intrahippocampal LPS injections reduce Abeta load in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 22, 1007-1012

Dretzen G, Bellard M, Sassone-Corsi P, Chambon P (1981): A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal Biochem* 112, 295-298

Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr., Swartz MN (1993): Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 328, 21-28

Ebert S, Gerber J, Bader S, Muhlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159, 87-96

Ebert S, Goos M, Rollwagen L, Baake D, Zech WD, Esselmann H, Wiltfang J, Mollenhauer B, Schliebs R, Gerber J, Nau R (2010): Recurrent systemic infections with *Streptococcus pneumoniae* do not aggravate the course of experimental neurodegenerative diseases. *J Neurosci Res* 88, 1124-1136

Eidinger D, Garrett TJ (1972): Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J Exp Med* 136, 1098-1116

Elghetany MT, Saleem A (1988): Methods for staining amyloid in tissues: a review. *Stain Technol* 63, 201-212

Elie M, Cole MG, Primeau FJ, Bellavance F (1998): Delirium risk factors in elderly hospitalized patients. *J Gen Intern Med* 13, 204-212

Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874

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

Fratiglioni L, Launer LJ, Andersen K, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Lobo A, Martinez-Lage J, Soininen H, Hofman A (2000): Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54, 10-15

Fuchs G, Schlegel HG: *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007

Gerber J, Pohl K, Sander V, Bunkowski S, Nau R (2003): Rifampin followed by ceftriaxone for experimental meningitis decreases lipoteichoic acid concentrations in cerebrospinal fluid and reduces neuronal damage in comparison to ceftriaxone alone. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1313-1317

Glode MP, Sutton A, Moxon ER, Robbins JB (1977): Pathogenesis of neonatal *Escherichia coli* meningitis: induction of bacteremia and meningitis in infant rats fed *E. coli* K1. *Infect Immun* 16, 75-80

Granholm NA, Cavallo T (1992): Autoimmunity, polyclonal B-cell activation and infection. *Lupus* 1, 63-74

Grimwood K, Anderson P, Anderson V, Tan L, Nolan T (2000): Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child* 83, 111-116

Gross U: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009

Guntern R, Bouras C, Hof PR, Vallet PG (1992): An improved thioflavine S method for staining neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease. *Experientia* 48, 8-10

Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2009

Hang L, Slack JH, Amundson C, Izui S, Theofilopoulos AN, Dixon FJ (1983): Induction of murine autoimmune disease by chronic polyclonal B cell activation. *J Exp Med* 157, 874-883

Hardy J (2006): A hundred years of Alzheimer's disease research. *Neuron* 52, 3-13

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

Hauss-Wegrzyniak B, Dobrzanski P, Stoehr JD, Wenk GL (1998): Chronic neuroinflammation in rats reproduces components of the neurobiology of Alzheimer's disease. *Brain Res* 780, 294-303

Herber DL, Roth LM, Wilson D, Wilson N, Mason JE, Morgan D, Gordon MN (2004): Time-dependent reduction in Abeta levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice. *Exp Neurol* 190, 245-253

Herber DL, Mercer M, Roth LM, Symmonds K, Maloney J, Wilson N, Freeman MJ, Morgan D, Gordon MN (2007): Microglial activation is required for Abeta clearance after intracranial injection of lipopolysaccharide in APP transgenic mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 2, 222-231

Holmes C, Cotterell D (2009): Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease: implications for treatment. *CNS Drugs* 23, 993-1002

Holmes C, El-Okl M, Williams AL, Cunningham C, Wilcockson D, Perry VH (2003): Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 788-789

Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry VH (2009): Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73, 768-774

Hsiao K, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, Xu S, Eckman C, Younkin S, Price D (1995): Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 15, 1203-1218

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

in t' Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MM, Stricker BH (2001): Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 345, 1515-1521

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

Jarrard LE (1993): On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 60, 9-26

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736

Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001): Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 372-381

Kearney JF, Lawton AR (1975): B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. I. Generation of cells synthesizing four major immunoglobulin classes. *J Immunol* 115, 671-676

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011): Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91, 461-553

King DL, Arendash GW (2002): Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol Behav* 75, 627-642

Klein SL (2000): The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 627-638

Korhonen TK, Valtonen MV, Parkkinen J, Vaisanen-Rhen V, Finne J, Orskov F, Orskov I, Svenson SB, Makela PH (1985): Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* 48, 486-491

Koyama A, Okereke OI, Yang T, Blacker D, Selkoe DJ, Grodstein F (2012): Plasma Amyloid-beta as a Predictor of Dementia and Cognitive Decline: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Neurol* 69, 824-831

Lee JW, Lee YK, Yuk DY, Choi DY, Ban SB, Oh KW, Hong JT (2008): Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation* 5, 37-50

Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003): Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8514-8519

Livermore DM (2005): Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother* 56, 611-614

Lotz M, Ebert S, Esselmann H, Iliev AI, Prinz M, Wiazewicz N, Wiltfang J, Gerber J, Nau R (2005): Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. *J Neurochem* 94, 289-298

Lukiw WJ, Bazan NG (2000): Neuroinflammatory signaling upregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 25, 1173-1184

Lüllmann H, Mohr K, Lutz H: *Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010

Mackenzie IR, Munoz DG (1998): Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology* 50, 986-990

Masuhr KF, Neumann M: Neurologie. (Duale Reihe), 6. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007

Mattson MP (1997): Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77, 1081-1132

McGeer PL, McGeer EG (1995): The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21, 195-218

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

Morgan D, Gordon MN, Tan J, Wilcock D, Rojiani AM (2005): Dynamic complexity of the microglial activation response in transgenic models of amyloid deposition: implications for Alzheimer therapeutics. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 743-753

Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60

Morris R, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982): Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683

Murray AM, Levkoff SE, Wetle TT, Beckett L, Cleary PD, Schor JD, Lipsitz LA, Rowe JW, Evans DA (1993): Acute delirium and functional decline in the hospitalized elderly patient. *J Gerontol* 48, 181-186

Nau R, Brück W (2002): Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci* 25, 38-45

Nau R, Eiffert H (2002): Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 15, 95-110

Nau R, Soto A, Bruck W (1999a): Apoptosis of neurons in the dentate gyrus in humans suffering from bacterial meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 265-274

Nau R, Wellmer A, Soto A, Koch K, Schneider O, Schmidt H, Gerber J, Michel U, Bruck W (1999b): Rifampin reduces early mortality in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Infect Dis* 179, 1557-1560

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002): Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3, 216-227

Nguyen MD, D'Aigle T, Gowing G, Julien JP, Rivest S (2004): Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 24, 1340-1349

Olsen NJ, Kovacs WJ (1996): Gonadal steroids and immunity. *Endocr Rev* 17, 369-384

Ovchinnikov YA, Monastyrskaya GS, Guriev SO, Kalinina NF, Sverdlov ED, Gragerov AI, Bass IA, Kiver IF, Moiseyeva EP, Igumnov VN, Mindlin SZ, Nikiforov VG, Khesin RB (1983): RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli*: sequence changes and dominance. *Mol Gen Genet* 190, 344-348

Paganini-Hill A, Henderson VW (1994): Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. *Am J Epidemiol* 140, 256-261

Perry VH, Newman TA, Cunningham C (2003): The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 4, 103-112

Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007): Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161-167

Pike CJ, Rosario ER, Nguyen TV (2006): Androgens, aging, and Alzheimer's disease. *Endocrine* 29, 233-241

Pluschke G, Mayden J, Achtman M, Levine RP (1983): Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun* 42, 907-913

Qiao X, Cummins DJ, Paul SM (2001): Neuroinflammation-induced acceleration of amyloid deposition in the APPV717F transgenic mouse. *Eur J Neurosci* 14, 474-482

Quinn J, Montine T, Morrow J, Woodward WR, Kulhanek D, Eckenstein F (2003): Inflammation and cerebral amyloidosis are disconnected in an animal model of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 137, 32-41

Rocca WA, Amaducci LA, Schoenberg BS (1986): Epidemiology of clinically diagnosed Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 19, 415-424

Rosario ER, Pike CJ (2008): Androgen regulation of beta-amyloid protein and the risk of Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* 57, 444-453

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491

Schiffer MS, Oliveira E, Glode MP, McCracken GH, Jr., Sarff LM, Robbins JB (1976): A review: relation between invasiveness and the K1 capsular polysaccharide of *Escherichia coli*. *Pediatr Res* 10, 82-87

Schütze S, Loleit T, Zeretzke M, Bunkowski S, Bruck W, Ribes S, Nau R (2012): Additive Microglia-Mediated Neuronal Injury Caused by Amyloid-beta and Bacterial TLR Agonists in Murine Neuron-Microglia Co-Cultures Quantified by an Automated Image Analysis using Cognition Network Technology. *J Alzheimers Dis* 31, 651-657

Schuurs AH, Verheul HA (1990): Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem* 35, 157-172

Scoville WB, Milner B (1957): Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20, 11-21

Sheng JG, Bora SH, Xu G, Borchelt DR, Price DL, Koliatsos VE (2003): Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in APP^{swe} transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14, 133-145

Sondag CM, Combs CK (2004): Amyloid precursor protein mediates proinflammatory activation of monocytic lineage cells. *J Biol Chem* 279, 14456-14463

Spreer A, Kerstan H, Bottcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R (2003): Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2649-2654

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

Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ (1997): Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology* 48, 626-632

Streit WJ (2004): Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res* 77, 1-8

Stringaris AK, Geisenhainer J, Bergmann F, Balshusemann C, Lee U, Zysk G, Mitchell TJ, Keller BU, Kuhnt U, Gerber J, Spreer A, Bahr M, Michel U, Nau R (2002): Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis* 11, 355-368

Stuertz K, Schmidt H, Eiffert H, Schwartz P, Mader M, Nau R (1998): Differential release of lipoteichoic and teichoic acids from *Streptococcus pneumoniae* as a result of exposure to beta-lactam antibiotics, rifamycins, trovafloxacin, and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 277-281

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R (1996): Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348, 429-432

Van Everbroeck B, Dobbeleir I, De WM, De LE, Lubke U, Martin JJ, Cras P (2004): Extracellular protein deposition correlates with glial activation and oxidative stress in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 108, 194-200

Verdier Y, Zarandi M, Penke B (2004): Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J Pept Sci* 10, 229-248

Vlad SC, Miller DR, Kowall NW, Felson DT (2008): Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology* 70, 1672-1677

Wallesch CW, Förstl H: Demenzen. (Referenz-Reihe Neurologie - Klinische Neurologie), 1. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Wellmer A, Noeske C, Gerber J, Munzel U, Nau R (2000): Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. *Neurosci Lett* 296, 137-140

Welsch U: Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. (Sobotta), 2. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München 2006

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002): The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22, 1858-1867

Whitton PS (2007): Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 150, 963-976

Wyss-Coray T, Mucke L (2002): Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35, 419-432

Zuk M, McKean KA (1996): Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int J Parasitol* 26, 1009-1023

Zysk G, Bruck W, Gerber J, Bruck Y, Prange HW, Nau R (1996): Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 722-728

Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Roland Nau für die sehr gute und umfassende Unterstützung sowie die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Dissertation anfertigen zu dürfen, bedanken.

Ein besonders großer Dank geht außerdem an meine liebe Betreuerin Frau PD Dr. med. Sandra Schütze, die mir in jeglichen Situationen mit vielen wertvollen Ratschlägen zur Seite stand. Für ihr Vertrauen und ihre herausragende Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. W. Brück möchte ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Dissertation zu absolvieren, und für die Bereitstellung der Räumlichkeiten danken.

Außerdem danke ich Frau Stefanie Bunkowski für die hervorragende histologische Aufarbeitung der Gewebeproben und ihrer außerordentliche Hilfsbereitschaft. Und auch den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. R. Nau sei hiermit ganz herzlich für die freundliche Zusammenarbeit gedankt.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. med. M. Kreutzfeld für seine Hilfe bei der Auswertung der Thioflavin-Schnitte. Ich danke Frau Sautter von der TSE-Systems GmbH in Bad Homburg für die Hilfe mit dem Water-Maze-Programm.

Lebenslauf

Ich wurde als zweites Kind der Hauswirtschaftsmeisterin Monika Döpke, geb. Petring, und des Diplom-Ingenieurs Karl-Heinz Döpke in Lübbecke, Nord-Rhein-Westfalen, am 11. April 1987 geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Grundschule Varl wechselte ich 1997 an das Gymnasium der Stadt Rahden. Dort erlangte ich im Jahr 2006 die Allgemeine Hochschulreife mit den Leistungskursen Mathematik und Biologie und der Abschlussnote 1,5.

Ab dem Wintersemester 2006/2007 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen.

Im Herbst 2008 bestand ich den Ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0.

Mit der Anfertigung meiner Dissertation begann ich 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Nau in der Arbeitsgruppe für Neuroinfektiologie aus der Abteilung Neuropathologie.

Den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im November 2012 mit der Note 1,5.

Neben dem Studium war ich als studentische Hilfskraft 2008 im Institut für Anatomie und Embryologie und von 2009 bis 2010 im STÄPS (Studentisches Trainingszentrum Ärztlicher Praxis und Simulation) der Georg-August-Universität Göttingen angestellt.

Im März 2013 beginne ich als Assistenzärztin in der Inneren Medizin in Düsseldorf.