

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

**Therapiemöglichkeiten der Alzheimer-
Krankheit durch passive Immunisierung
mit dem NT4X-Antikörper im
Tg4-42_{hom}-Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Henning Borgers

aus

Coesfeld

Göttingen 2017

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

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

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Therapiemöglichkeiten der Alzheimer-Krankheit durch passive Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper im Tg4-42_{hom}-Mausmodell“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

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

***geteilte Erstautorenschaft**

Bouter Y, Kacprowski T, Weissmann R, Dietrich K, **Borgers H**, Brauß A, Sperling C, Wirths O, Albrecht M, Jensen LR et al. (2014): Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing. *Front Aging Neurosci* 6, 75

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie	1
1.1.1 Risikofaktoren.....	1
1.2 Klinische Merkmale	2
1.2.1 Symptomatik und Verlauf.....	2
1.2.2 Diagnostik	3
1.2.3 Therapie	4
1.3 Histopathologische Kennzeichen	4
1.3.1 Amyloid-Plaques.....	4
1.3.2 Neurofibrillenbündel aus dem Tau-Protein.....	5
1.3.3 Entzündung.....	5
1.3.4 Zerebrale Amyloidangiopathie.....	6
1.3.5 Neurodegeneration und Atrophie	6
1.4 A β -Metabolismus und Bedeutung für die Alzheimer-Pathogenese	7
1.4.1 Die Entstehung von A β aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP)	7
1.4.1.1 Nicht-amyloidogener Weg	7
1.4.1.2 Amyloidogener Weg.....	8
1.4.2 Amyloid-Hypothese.....	9
1.4.3 Physiologische Eigenschaften von A β	11
1.4.4 A β -Varianten.....	11
1.4.4.1 A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42}	12
1.4.5 A β -Aggregation	13
1.5 Genetik.....	13
1.6 Mausmodelle für den Morbus Alzheimer.....	15
1.6.1 Tg4-42-Mausmodell.....	16
1.7 Neue Therapieansätze.....	17
1.7.1 Aktive Immunisierung.....	17
1.7.2 Passive Immunisierung.....	18
1.7.2.1 Solanezumab, Crenezumab und Bapineuzumab	18
1.7.2.2 Aducanumab	18
1.7.2.3 NT4X	19
1.7.3 Weitere Therapieansätze	19
1.8 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit.....	20

2	Material und Methoden	21
2.1	Tiere.....	21
2.1.1	Haltungsbedingungen.....	21
2.1.2	Transgene Tg4-42 _{hom} -Mauslinie.....	21
2.1.2.1	Benennung der Tg4-42 _{hom} -Gruppen nach Alter	22
2.1.3	Nachweis des Transgens bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen	22
2.1.3.1	DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien.....	22
2.1.3.2	Nukleinsäure-Quantifizierung.....	22
2.1.3.3	Nukleinsäure-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.1.3.4	Gel-Elektrophorese.....	23
2.2	NT4X-Antikörper	24
2.2.1	Charakterisierung des NT4X-Antikörpers mit synthetischen Peptiden.....	24
2.2.2	Intraperitoneale Injektion	25
2.3	Verhaltenstests	26
2.3.1	String Suspension-Test.....	26
2.3.2	Balance Beam-Test.....	27
2.3.3	Clasping.....	28
2.3.4	Morris Water Maze	29
2.3.5	Cross Maze	31
2.4	Gewinnung und Präparation von Hirngewebe.....	32
2.4.1	Genickbruch.....	32
2.4.2	Perfusion.....	33
2.5	Quantifizierung der Neuronenzahl.....	34
2.5.1	Schneiden am Kryotom	34
2.5.2	Kresylviolett-Färbung.....	34
2.5.3	Stereologie	35
2.6	Statistik.....	37
2.7	Software	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Nachweis des Transgens bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen	38
3.2	Das Tg4-42 _{hom} -Mausmodell im Altersverlauf.....	39
3.2.1	Gewicht im Altersverlauf.....	39
3.2.2	Motorische Tests im Altersverlauf	40
3.2.3	Morris Water Maze im Altersverlauf.....	41
3.2.4	Cross Maze im Altersverlauf	44
3.2.5	Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus im Altersverlauf.....	45
3.3	Behandlungsplan.....	46
3.4	Charakterisierung des NT4X-Antikörpers mit synthetischen Peptiden.....	47
3.5	Behandelte Tiere im Vergleich	48
3.5.1	Gewichtsverlauf bei behandelten Mäusen.....	48
3.5.2	Morris Water Maze bei behandelten Mäusen	49
3.5.3	Weitere Verhaltenstests bei behandelten Mäusen.....	52
3.5.4	Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus bei behandelten Mäusen	53

4	Diskussion	55
4.1	Die Expression von A β ₄₋₄₂ führt bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen altersabhängig zu Nervenzellverlust und Verhaltensdefiziten.....	55
4.2	Zeitpunkt der Behandlung und Dosierung von NT4X	59
4.3	Reduktion des Nervenzellverlustes in der hippocampalen CA1-Region und Verbesserung des Lernverhaltens durch passive Immunisierung mit NT4X bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen	60
4.3.1	Wirkungsweise des NT4X-Antikörpers.....	62
4.3.2	Penetration von NT4X durch die Blut-Hirn-Schranke.....	63
4.3.3	Bewertung von NT4X als mögliches Therapeutikum für die passive Immunisierung von Alzheimer-Patienten in klinischen Studien	65
4.4	Ausblick.....	67
5	Zusammenfassung	70
6	Literaturverzeichnis	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Enzymatische Aufspaltung von APP.....	9
Abbildung 2: Die ursprüngliche und die modifizierte β -Amyloid-Kaskade.....	10
Abbildung 3: Das Transgen bei der Tg4-42-Mauslinie.	17
Abbildung 4: Versuchsaufbau für den String Suspension-Test.	27
Abbildung 5: Versuchsaufbau für den Balance Beam-Test.	28
Abbildung 6: Versuchsaufbau des Morris Water Maze.	30
Abbildung 7: Versuchsaufbau für das Cross Maze.	32
Abbildung 8: Zählrahmen und -regeln für die Design-basierte Stereologie.	36
Abbildung 9: Gelelektrophoretischer Nachweis des Transgens bei Mäusen der Tg4-42-Linie.	38
Abbildung 10: Übersicht der Experimente zur Ermittlung des optimalen Behandlungszeitpunktes.	39
Abbildung 11: Körpergewicht zum Todeszeitpunkt bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen im Alter von 5 bis 7 Monaten.	40
Abbildung 12: Unauffällige motorische Tests im Altersverlauf.....	41
Abbildung 13: Altersabhängige Beeinträchtigungen des räumlichen Bezugsgedächtnisses im Morris Water Maze bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen.	43
Abbildung 14: Unbeeinträchtigtes Arbeitsgedächtnis im Cross Maze bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen im Altersverlauf.	44
Abbildung 15: Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen im Altersverlauf.	46
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Behandlungsplans für Tg4-42 _{hom} -Mäuse.	47
Abbildung 17: Bindungseigenschaften des Antikörpers NT4X im Western Blot mit synthetischen Peptiden.	48
Abbildung 18: Unauffällige Gewichtsentwicklung der behandelten Tg4-42 _{hom} -Mäuse.	49
Abbildung 19: Verbesserung des Lernverhaltens im Morris Water Maze durch die passive Immunisierung mit NT4X bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen.	51
Abbildung 20: Weitere Verhaltenstests der mit NT4X bzw. PBS behandelten Tg4-42 _{hom} -Mäuse.....	52
Abbildung 21: Reduktion des Nervenzellverlustes in der hippocampalen CA1-Region bei Tg4-42 _{hom} -Mäusen durch die passive Immunisierung mit NT4X.	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Protokoll der Temperaturzyklen.....	23
Tabelle 2: Punkteschlüssel beim String Suspension-Test (Moran et al. 1995).	27
Tabelle 3: Punkteschlüssel für das Claspig-Verhalten (Miller et al. 2008).	29
Tabelle 4: Start- und Zielpositionen für das Morris Water Maze.....	31
Tabelle 5: Formeln zur Berechnung der Gesamtneuronenzahl in der CA1-Region.....	36
Tabelle 6: Erklärungen der Abkürzungen aus Tabelle 5.....	36
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Software.....	37

Abkürzungsverzeichnis

A β	Beta-Amyloid
A β _{pE3-x}	N-terminal trunkiertes A β , das mit Pyroglutamyl startet
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AMT	adsorptionsvermittelte Transzytose
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid precursor protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
BACE	<i>β-site APP cleaving enzyme</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CAA	<i>cerebral amyloid angiopathy</i> (zerebrale Amyloidangiopathie)
CT	Computertomographie
CTF	<i>C-terminal-fragment</i>
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
EEG	Elektroenzephalographie
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAD	<i>familial Alzheimer disease</i> (familiäre Alzheimer-Krankheit)
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society of Laboratory Animal Science
IgG	Immunglobulin G
ICD	International Classification of Diseases
MCI	<i>mild cognitive impairment</i>
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MRT	Magnetresonanztomographie
N-Terminus	Amino-Terminus
NFT	<i>neurofibrillary tangles</i> (Neurofibrillenbündel)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	<i>non-treated</i> (unbehandelt)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PHF	<i>paired helical filaments</i> (gepaarte helikale Filamente)
PiB	<i>Pittsburgh compound B</i>

PS	Präsenilin
sAPP α	<i>secreted amyloid precursor protein a</i>
RMT	rezeptorvermittelte Transzytose
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SPF	spezifisch pathogenfreie Bedingungen
TACE	<i>tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i>
Tg4-42 _{hom}	Mäuse der Tg4-42-Linie mit Homozygotie für das Transgen
TRH	Thyreotropin Releasing-Hormon
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung der UMG

1 Einleitung

Die Alzheimer-Krankheit bzw. der Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung und für den größten Teil der Demenzerkrankungen beim älteren Menschen verantwortlich. Die Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht hinreichend geklärt, auch wenn sich die Hinweise darauf verdichten, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen mit einem Schwerpunkt auf intraneuronalem und löslichem Beta-Amyloid (A β) handelt (Wirhth et al. 2004; Benilova et al. 2012).

Für die Krankheit, die erstmals 1907 von dem deutschen Psychiater Alois Alzheimer beschrieben wurde (Alzheimer 1907), gibt es bis heute noch keine den Krankheitsprogress aufhaltende Therapie.

1.1 Epidemiologie

Der Morbus Alzheimer ist mit einem Anteil von 50-75% die häufigste Demenzerkrankung und betrifft etwa 23 bis 35 Millionen Menschen weltweit (Alzheimer's Disease International 2015; Cacace et al. 2016). Die meisten Patienten erkranken an der senilen Form von Alzheimer, die ab einem Alter von 65 Jahren symptomatisch wird. Etwa 5-10% der Betroffenen erkranken an der präsenilen Form, die vor dem 65. Lebensjahr auftritt. In dieser Gruppe ist in etwa der Hälfte der Fälle ein Verwandter ersten Grades ebenfalls erkrankt und 10-15% zeigen eine autosomal-dominante Vererbung, die auf verschiedene Mutationen zurückzuführen ist (Campion et al. 1999; Jarmolowicz et al. 2015; Cacace et al. 2016), (Absatz 1.5). Diese familiäre Form der Alzheimer-Krankheit (FAD) steht der sporadischen, familiär nicht gehäuften Form gegenüber. Die FAD ist mit einer Prävalenz von unter 0,1% eher selten (Harvey et al. 2003; Blennow et al. 2006).

Durch den demographischen Wandel und die gestiegene Lebenserwartung wird sich die Zahl der Erkrankten in Zukunft voraussichtlich alle 20 Jahre fast verdoppeln, was weitreichende gesellschaftliche und ökonomische Auswirkungen haben wird (Ferri et al. 2005; Alzheimer's Disease International 2015).

1.1.1 Risikofaktoren

Die Pathogenese der Alzheimer-Krankheit ist ein multifaktorielles Geschehen, das wahrscheinlich auf eine Kombination von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen zurückzuführen ist. Die genetischen Komponenten in der Krankheitsentstehung sind im Absatz 1.5 dargestellt. Von den nichtgenetischen Ursachen ist das Alter der mit Abstand wichtigste Risikofaktor. So verdoppelt sich ab einem Alter von 65 Jahren alle 5 Jahre das Risiko, an Alzheimer zu erkranken (Hebert et al. 1995; Blennow et al. 2006). Darüber hinaus korreliert ein niedriger sozioökonomischer Status hinsichtlich Bildung, beruflichem Ansehen

und Einkommen sowie niedrige geistige Fähigkeiten in der Kindheit mit einem höheren Erkrankungsrisiko (Evans et al. 1997; Whalley et al. 2000). Außerdem bestehen Assoziationen zu Schädel-Hirn-Traumata, oxidativem Stress, Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonie, Rauchen, Diabetes, Trisomie 21 und einer geringen mentalen und physischen Aktivität (Mayeux et al. 1993; Simons et al. 1998; Smith et al. 2000; Crisby et al. 2002; Mayeux 2003; Qiu und Folstein 2006; Kehoe und Wilcock 2007).

1.2 Klinische Merkmale

1.2.1 Symptomatik und Verlauf

Die Symptomatik beim Morbus Alzheimer ist im Krankheitsverlauf chronisch progredient und lässt sich in drei verschiedene Stadien einteilen, die jedoch nicht immer sicher voneinander abgegrenzt werden können.

Im präklinischen Stadium bestehen im Gehirn von Alzheimer-Patienten bereits histologische und bildmorphologische Veränderungen sowie eine Divergenz der Biomarker, ohne dass die Krankheit jedoch klinisch manifest wird (Sperling et al. 2011). Histologische Pathologien wie die Ablagerung von Beta-Amyloid oder die Neurodegeneration können dem Auftreten klinischer Symptome um Jahre bis Jahrzehnte vorausgehen (Blennow et al. 2006; Villemagne et al. 2013).

Das Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung oder *mild cognitive impairments* (MCI) ist als symptomatische prä-demenzielle Phase durch kognitive und funktionelle Störungen gekennzeichnet. Zu den kognitiven Störungen zählen Beeinträchtigungen von Gedächtnis, exekutiven Funktionen, Aufmerksamkeit, Sprache sowie räumlich-visueller Wahrnehmung und Orientierung. Daneben ist die Ausführung komplexer funktioneller Abläufe im Alltag hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit, Effizienz oder Fehlerlosigkeit gestört, ohne jedoch die Unabhängigkeit der Betroffenen in ihrem sozialen und beruflichen Umfeld aufzuheben (Albert et al. 2011). Im Rahmen von nicht-kognitiven Symptomen kommt es bei Betroffenen bisweilen zu affektiven Beeinträchtigungen und zu Störungen vegetativer Funktionen wie beispielsweise dem Riechempfinden (Förstl und Kurz 1999; Alves et al. 2014). Von den Patienten mit MCI entwickeln etwa 10-15% pro Jahr das klinische Vollbild des Morbus Alzheimer (Grundman et al. 2004).

Im Stadium der manifesten Alzheimer-Erkrankung kommt es durch die Aggravation der kognitiven, funktionellen, vegetativen und motorischen Störungen zu einem Verlust der Eigenständigkeit. Die Patienten werden oft inkontinent, stumm, bettlägerig und somit vollständig pflegebedürftig (McKhann et al. 2011; Holtzman et al. 2011). Die Beeinträchtigung grundlegender motorischer Funktionen wie der des Schluckaktes kann über die Entwicklung einer Aspirationspneumonie deutlich zur Verminderung der Lebenserwartung beitragen (Wada et al. 2001).

Der Morbus Alzheimer verläuft auch bei optimaler Therapie chronisch progredient. Die mittlere Überlebenszeit beträgt bei betroffenen Patienten nach der Erstdiagnose etwa 5-8 Jahre (Förstl und Kurz 1999).

1.2.2 Diagnostik

Eine gesicherte Diagnosestellung kann für den Morbus Alzheimer nur histologisch und somit *post mortem* erfolgen. Allerdings gibt es klinische Kriterien, beispielsweise in der ICD-10-Klassifikation, und apparative Untersuchungen, die das Vorliegen einer Alzheimer-Erkrankung wahrscheinlich machen (McKhann et al. 2011; Leitlinie Demenzen 2016).

Nach den ICD-10-Kriterien müssen Patienten für die Diagnose einer Demenz für mindestens 6 Monate Gedächtnisstörungen und weitere kognitive Beeinträchtigungen wie eine reduzierte Urteilsfähigkeit oder ein eingeschränktes Denkvermögen aufweisen sowie Störungen von Affekt, Antrieb und Sozialverhalten und damit einhergehende alltagsrelevante Einschränkungen zeigen, ohne dass Hinweise auf einen vorübergehenden Verwirrheitszustand vorliegen. Für die Zuordnung zur Kategorie „Demenz bei Alzheimer-Krankheit“ ist darüber hinaus eine differenzierte Ausschlussdiagnostik nötig (Hacke 2016).

Bei klinischem Verdacht sollte zunächst eine neuropsychologische Testung des Patienten erfolgen. Hierfür bieten sich im klinischen Alltag verschiedene Testverfahren wie zum Beispiel der Mini-Mental-Status-Test (MMST) an, bei dem kognitive Defizite wie Aufmerksamkeit, Kurz- und Langzeitgedächtnis, exekutive Funktionen und räumlich-visuelle Fähigkeiten anhand verschiedener Fragen und Aufgaben evaluiert werden (Folstein et al. 1975). Auf diese Weise kann eine Einteilung der Alzheimer-Erkrankung in ein leichtes, mittelschweres und schweres Stadium erfolgen (Leitlinie Demenzen 2016).

Zur Erhärtung der Verdachtsdiagnose bzw. zur differenzialdiagnostischen Abgrenzung kommen verschiedene weitere Untersuchungen zum Einsatz. Laborchemisch wird neben der Basisdiagnostik auch der Liquor cerebrospinalis untersucht, in dem der typische Befund einer (Phospho-)Tau-Protein-Erhöhung und einer $A\beta_{42}$ -Verminderung erhoben werden kann (Blennow und Zetterberg 2009).

In der Bildgebung ist die Magnetresonanztomographie (MRT) und alternativ die Computertomographie (CT) die Methode der Wahl. Hier ist eine für den Morbus Alzheimer typische generalisierte Hirnatrophie mit Betonung des medialen Temporallappens ein sensitiver diagnostischer Marker (Frisoni et al. 2010). Darüber hinaus lässt sich mithilfe der Positronenemissionstomographie (PET) zum Teil bereits im präklinischen Stadium ein reduzierter Metabolismus in den betroffenen Regionen nachweisen. Diese Technik kommt jedoch nur in Ausnahmefällen zum Einsatz (Mosconi et al. 2010; Leitlinie Demenzen 2016).

Die Elektroenzephalographie (EEG), die Sonographie der hirnversorgenden Gefäße und eine genetische Beratung aus differenzialdiagnostischen Gründen sind nur in seltenen Fällen indiziert (Leitlinie Demenzen 2016).

1.2.3 Therapie

Nach der aktuellen S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) und der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (DGPPN) beschränken sich die Therapiemöglichkeiten des Morbus Alzheimer derzeit auf rein symptomatische Ansätze. Im Zentrum stehen hier psychosoziale Behandlungsmethoden wie lebenspraktische Übungen und Orientierungshilfen zur Alltagsbewältigung sowie die medikamentöse Therapie. Hierbei werden bei leichter bis mittelschwerer Demenz Acetylcholinesterase-Hemmer wie die Wirkstoffe Donepezil, Rivastigmin oder Galantamin eingesetzt, um das cholinerge Defizit im Gehirn zu behandeln, das vor allem aufgrund der Neurodegeneration im Nucleus basalis Meynert entsteht (Absatz 1.3.5). Außerdem ist der nichtkompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantine für die Behandlung des Morbus Alzheimer vor allem im moderaten bis schweren Stadium zugelassen und kann als Monotherapie oder auch in Kombination mit Acetylcholinesterase-Hemmern verabreicht werden. Neben diesen beiden Medikamentenklassen gibt es zahlreiche weitere Substanzen wie Ginkgo Biloba, Vitamin E oder nichtsteroidale Antiphlogistika, für die bisher jedoch die Wirksamkeit nicht sicher belegt ist. Außerdem ist bei Bedarf eine Behandlung von begleitenden affektiven, psychotischen, vegetativen und anderen Symptomen indiziert (Leitlinie Demenzen 2016).

1.3 Histopathologische Kennzeichen

Im Gehirn von Alzheimer-Patienten zeigen sich verschiedene charakteristische histologische Pathologien. An zentraler Stelle sind hierbei extrazelluläre senile Plaques aus Beta-Amyloid, intrazelluläre Neurofibrillenbündel aus Tau-Protein-Konglomeraten, entzündliche Prozesse sowie die zerebrale Amyloidangiopathie zu nennen, die über unterschiedliche Wege zu einer Schädigung und Atrophie bestimmter Hirnregionen und damit einhergehend zu der für die Krankheit typischen Symptomatik führen (Absatz 1.2.1). Nachfolgend ist ein Überblick über die wichtigsten histopathologischen Merkmale und deren Rolle bei der Entstehung des Morbus Alzheimer dargestellt.

1.3.1 Amyloid-Plaques

Sogenannte senile Amyloid-Plaques bestehen hauptsächlich aus der Isoform $A\beta_{1-42}$. Dieses und weitere $A\beta_{42}$ -Varianten können extrazellulär aufgrund der hohen Aggregationsneigung als eine Art Kondensationszentrum agieren und eine Kettenreaktion auslösen, die in der Plaque-Entstehung mündet (Hu et al. 2009; Portelius et al. 2010). Diese Annahme wird durch das zeitlich frühe Auftreten von $A\beta_{42}$ in der Alzheimer-Entstehung sowie dessen hohe Konzentration in diesen Plaques unterstützt (Lippa et al. 1998).

Für die Pathogenese des Morbus Alzheimer galten extrazelluläre Amyloid-Plaques lange Zeit als Hauptauslöser. Inzwischen werden die Plaques als weitestgehend inaktiv angesehen und stattdessen lösliche $A\beta$ -Oligomere für die Entstehung der Krankheit verantwortlich

gemacht (Shankar et al. 2008). Diese Annahme wird durch die fehlende Korrelation von Plaques mit klinischen Symptomen sowie durch deren Auftreten beim normalen Altern gestärkt (Perrin et al. 2009; Benilova et al. 2012). Allerdings wirken Amyloid-Plaques möglicherweise als eine Art Reservoir für lösliche toxische A β -Oligomere (Haass und Selkoe 2007).

1.3.2 Neurofibrillenbündel aus dem Tau-Protein

Das Tau-Protein wurde 1975 erstmals isoliert und erfüllt im menschlichen Organismus als Stabilisator der zytoskelettalen Mikrotubuli eine zelluläre Stütz- und Transportfunktion (Weingarten et al. 1975). Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, die mit einer Akkumulation des Tau-Proteins einhergehen, werden unter dem Begriff Tauopathien, mit dem Morbus Alzheimer als deren wichtigsten Vertreter, zusammengefasst.

Bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit liegt das Tau-Protein in hyperphosphorylierter Form vor (Lee et al. 1991; Hanger et al. 2009). Dies führt zu einer erhöhten Neigung zur Bildung von gepaarten helikalen Filamenten (PHF), die den Hauptbestandteil der intrazellulären Neurofibrillenbündel (NFT) im Gehirn von Alzheimer-Patienten ausmachen (Alonso et al. 2001). Die Bedeutung dieser NFTs in der Alzheimer-Pathogenese wird kontrovers diskutiert. So gibt es Hinweise für eine Beteiligung der Fibrillen bei der Neurodegeneration durch direkte Toxizität oder als Mediator für die Toxizität von A β , was unter anderem durch die gute Korrelation zwischen NFTs und kognitiven Defiziten unterstützt wird (Holtzman et al. 2011; Ittner und Götz 2011). Allerdings gibt es auch Studien, die einen neuroprotektiven Einfluss von NFTs nahelegen (Castellani et al. 2008).

NFTs und A β sind beim Morbus Alzheimer oft an denselben Stellen zu finden, was eine gegenseitige Abhängigkeit nahelegt (Oddo et al. 2003). Darüber hinaus weisen viele Experimente in ihrer Zusammenschau auf lösliche A β -Oligomere als wichtigste Faktoren bei der Entstehung von NFTs hin (Nussbaum et al. 2013).

1.3.3 Entzündung

Geschädigte Nervenzellen, Beta-Amyloid und Neurofibrillenbündel wirken im Gehirn von Alzheimer-Patienten durch die Aktivierung von Komplementfaktoren, Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen und weiteren Entzündungsmediatoren proinflammatorisch (Akiyama et al. 2000). Die lokalen Mediatoren wirken aktivierend auf Astro- und Mikrogliazellen, wodurch es zur Gliose in den entsprechenden Hirnregionen kommt. Diese siedeln sich als inflammatorische Zellen des ZNS in direkter Nachbarschaft zu Amyloid-Plaques an (Itagaki et al. 1989; Edison et al. 2008; Medeiros und LaFerla 2013). Sie werden durch das A β in den Plaques angezogen, was für die Funktion der Plaques als Reservoir bioaktiver Moleküle spricht (Meyer-Luehmann et al. 2008). Die Bedeutung dieser inflammatorischen Prozesse als Ursache oder Folge der Erkrankung wird kontrovers diskutiert (Krause und Müller 2010). So gibt es einerseits zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung des entzündlichen Ge-

schehens an der Neurodegeneration, die den Einsatz antiinflammatorischer Substanzen als Therapiemöglichkeit nahelegen (t'Veld et al. 2001; McGeer und McGeer 2010; Heppner et al. 2015). Andererseits werden auch protektive und restitutive Eigenschaften der Entzündung diskutiert (Ziv et al. 2006; Krause und Müller 2010).

1.3.4 Zerebrale Amyloidangiopathie

Amyloidablagerungen in der Wand von gehirnversorgenden Gefäßen können zu einer zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) führen. Dabei kann es zu vaskulären Komplikationen wie Stenosen, Mikroaneurysmen oder thromboembolischen Ereignissen und damit zu konsekutiven zerebralen Ischämien oder Blutungen kommen (Hacke 2016). Die CAA ist eine eigenständige Krankheit, bei der im Gegensatz zum Morbus Alzheimer $A\beta_{40}$ als häufigste Proteinvariante nachgewiesen wurde (Suzuki et al. 1994b). Allerdings gibt es eine starke Assoziation und eine gegenseitige Beeinflussung dieser beiden Erkrankungen. So zeigen sich je nach Studie bei etwa 70-100% der Alzheimer-Patienten Ablagerungen von $A\beta$ in Gefäßwänden und es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die CAA negativ auf den klinischen Verlauf der Alzheimer-Krankheit einwirken kann (Attems et al. 2005; Smith und Greenberg 2009).

1.3.5 Neurodegeneration und Atrophie

Beim Morbus Alzheimer führt vor allem der Untergang von Nervenzellen und in geringerem Maße auch der Verlust von Synapsen und Axonen zu einer Atrophie bestimmter Hirnregionen. Dabei ist im Gegensatz zum normalen menschlichen Altern hauptsächlich die graue Substanz betroffen (Double et al. 1996).

Makroskopisch ist im Gehirn von Alzheimer-Patienten sowohl *post mortem* als auch bildmorphologisch mittels MRT eine Reduktion des Hirnparenchyms vor allem im Temporal- und Frontallappen zu erkennen (Jobst et al. 1994; O'Brien 1995; Double et al. 1996; Cullen et al. 1997). So kann im MRT eine Atrophie der besonders betroffenen Regionen des Hippocampus, des Gyrus parahippocampalis sowie der Amygdala nachgewiesen werden, um zum einen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die Alzheimer-Diagnose zu stellen und zum anderen zwischen MCI und fortgeschrittenen Stadien zu unterscheiden (Bottino et al. 2002; Jagust 2006).

Auf mikroskopischer Ebene konnte mithilfe der Stereologie ein signifikanter Alzheimer-assoziiertes Nervenzellverlust in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden. So wurde unter den hippocampalen Strukturen die CA1-Region mit einem Neuronenverlust von 48% als die am stärksten betroffene Region bezeichnet, während die Werte für den Nervenzelluntergang in Hilus und Subiculum mit 14% und 24% deutlich darunter lagen. Darüber hinaus ist die Neurodegeneration in der CA1-Region krankheitsspezifisch, also nicht mit normalem Altern assoziiert (West et al. 1994; West et al. 2004). Ähnlich stark betroffen ist der an den Hippocampus angrenzende entorhinale Kortex (Gómez-Isla et al.

1996; Price et al. 2001). Außerdem wurde ein Neuronenverlust im Nucleus basalis Meynert (Vogels et al. 1990), in der Amygdala (Vereecken et al. 1994), im Nucleus caeruleus (Busch et al. 1997) sowie in weiteren Regionen nachgewiesen. Die Neurodegeneration, besonders die in den für Gedächtnis, Lernen, Orientierung und Affektivität bedeutsamen Zentren des Hippocampus und entorhinalen Kortex, bietet ein passendes Korrelat zum klinischen Bild von Alzheimer-Patienten.

1.4 A β -Metabolismus und Bedeutung für die Alzheimer-Pathogenese

Die Isolierung und Identifizierung von A β als Hauptbestandteil der Proteinablagerungen bei der zerebralen Amyloidangiopathie (Glennner und Wong 1984) und der Nachweis verschiedener Subtypen von A β (Masters et al. 1985a) gaben den Startschuss für eine bis heute andauernde intensive Erforschung dieses Peptids als ein Hauptfaktor in der Pathogenese des Morbus Alzheimer.

1.4.1 Die Entstehung von A β aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP)

APP ist ein integrales Membranprotein, das beim Menschen überwiegend in den Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) und in deutlich geringerem Umfang auch in anderen Geweben exprimiert wird (Zheng und Koo 2006). Das APP-Gen ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert (Kang et al. 1987) und besteht aus einer großen, außenliegenden Proteindomäne am Amino-Terminus (N), einer einzelnen hydrophoben Transmembrandomäne und einem kurzen innenliegenden Teil am Carboxy-Terminus (C) (Selkoe 1994).

Die genaue Funktion von APP ist derzeit noch nicht hinreichend geklärt. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung an der Bildung und Übertragung von interneuronalen Synapsen und einer Reihe weiterer physiologischer Funktionen (Priller et al. 2006). So dient die extrazelluläre Region möglicherweise als Oberflächenrezeptor, Adhäsionsfaktor oder Co-Faktor für Zellmigration und Umbauprozesse an den Synapsen, während der intrazelluläre Teil beim axonalen Transport, der Apoptose und der zellulären Signaltransduktion beteiligt ist (Zheng und Koo 2006).

APP wird durch Proteasen in verschiedene Spaltprodukte zerschnitten. Dabei unterscheidet man den amyloidogenen Weg mit Beteiligung der β - und γ -Sekretasen von dem nicht-amyloidogenen Weg, der durch α - und γ -Sekretase-Aktivität charakterisiert ist (Abbildung 1).

1.4.1.1 Nicht-amyloidogener Weg

APP wird auf dem nicht-amyloidogenen Weg zunächst durch eine Gruppe von Proteasen gespalten, die in ihrer Gesamtheit als α -Sekretasen bezeichnet werden. Dazu zählen Enzyme aus der Gruppe der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Metalloproteasen, mit den Subtypen ADAM 17 bzw. TACE (*tumor necrosis factor- α -converting enzyme*) (Buxbaum et al.

1998), ADAM 9 (Hotoda et al. 2002), ADAM 10 (Lammich et al. 1999) und ADAM19 (Tanabe et al. 2007). Der Angriffspunkt für α -Sekretasen liegt innerhalb des A β -Bereichs von APP (Abbildung 1). Somit wirkt die enzymatische Aktivität der α -Sekretasen durch die Zerstörung dieses Bereichs protektiv gegen die Produktion oder die Ablagerung von A β und bildet spezifische Spaltprodukte (Postina 2008). Dabei handelt es sich zum einen um das aus dem extrazellulären N-terminalen Fragment bestehende lösliche sAPP α -Peptid und zum anderen um das aus dem membrangebundenen C-terminalen Fragment bestehende CTF83, das wiederum durch die γ -Sekretase in das nach extrazellulär sezernierte p3 und das im Zytoplasma verbleibende AICD50 gespalten wird (Chow et al. 2010).

Zusätzlich zum schützenden Effekt der α -Sekretasen gegen die Entstehung von A β wirkt auch das aus der Ektodomäne entstehende sAPP α selbst neuroprotektiv (Mattson et al. 1993; Furukawa et al. 1996). Außerdem erfüllt es eine wichtige Funktion für die synaptische Plastizität und das räumliche Gedächtnis, was möglicherweise die klinische Symptomatik von Alzheimer-Patienten beeinflussen kann (Roch et al. 1994; Taylor et al. 2008).

1.4.1.2 Amyloidogener Weg

Der amyloidogene Weg der APP-Prozessierung mündet in der Bildung des A β -Peptids, dem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer zugeschrieben wird (Abbildung 1).

Zunächst wird APP durch β -Sekretasen in das lösliche, aus der Ektodomäne bestehende sAPP β und das membranständige C-terminale Fragment CTF99 gespalten, das wiederum als Substrat der γ -Sekretase in das intrazelluläre AICD50 und das lösliche extrazelluläre A β -Peptid prozessiert wird (Vassar 2002).

Als β -Sekretasen wurden bisher die Enzyme BACE (*β -site APP cleaving enzyme*) 1 und 2 identifiziert, wobei die Bedeutung von BACE 1 bei weitem überwiegt und die Rolle von BACE 2 für die Pathogenese von Alzheimer offenbar nicht relevant ist (Chow et al. 2010).

Die γ -Sekretase, die auch bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung von APP beteiligt ist (Absatz 1.4.1.1), sorgt als integrales Membranprotein für die Bildung des Carboxy-Terminus von A β und ist somit eine wichtige Komponente in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit. Sie besteht aus PS1 (Presenilin-1) oder PS2 als katalytische Untereinheiten sowie den Co-Faktoren Nicastrin, APH-1a oder b und PEN-2 (Iwatsubo 2004; Wolfe 2008). Neben APP sind noch über 60 weitere Substrate bekannt, die durch den γ -Sekretase-Proteinkomplex mit seinen Untereinheiten in jeweils heterogener Zusammensetzung und unterschiedlicher Struktur prozessiert werden (Wakabayashi und Strooper 2008).

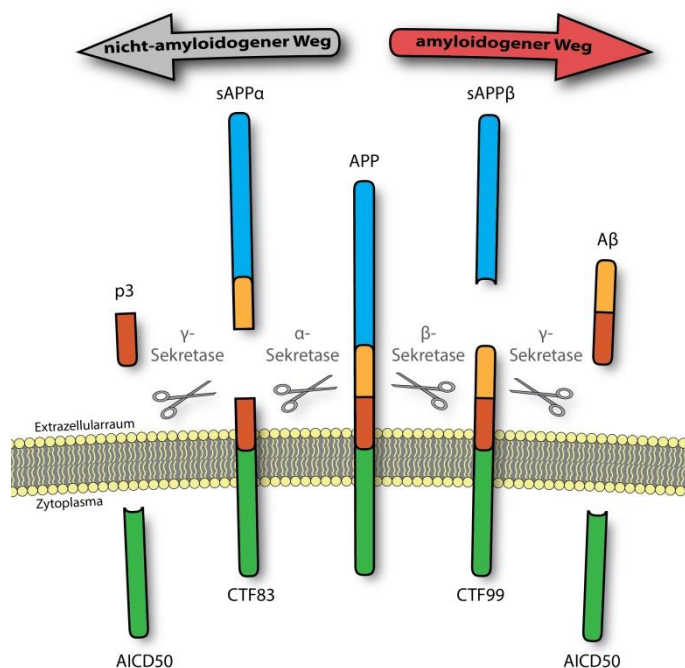


Abbildung 1: Enzymatische Aufspaltung von APP.

Bei der Prozessierung von APP unterscheidet man zwei Wege. Zum einen wird APP auf dem nicht-amyloidogenen Weg (links) durch α - und γ -Sekretasen in die extrazellulären Spaltprodukte sAPP α und p3 sowie das intrazellulär verbleibende AICD50 aufgespalten. AICD50 wird auch auf dem amyloidogenen Weg (rechts) in das Zytoplasma abgegeben, allerdings entsteht hier durch β - und γ -Sekretase-Aktivität extrazelluläres sAPP β und das für die Pathogenese des Morbus Alzheimer bedeutsame A β .

1.4.2 Amyloid-Hypothese

Vor dem Hintergrund der prominenten extrazellulären Plaques aus A β in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten entwickelten Hardy und Allsop 1991 die Hypothese einer A β -Kaskade. Diese besagt, dass extrazelluläre Ablagerungen von A β_{40} und A β_{42} für die Schädigungen und den Verlust von Synapsen und Neuronen sowie für die Atrophie bestimmter Hirnregionen und damit für die Entstehung des typischen klinischen Bildes der Alzheimer-Krankheit verantwortlich sind (Abbildung 2). Diese Theorie enthält jedoch einige Unstimmigkeiten. So korreliert das Auftreten seniler Amyloid-Plaques im Gegensatz zu intrazellulären Neurofibrillenbündeln kaum mit dem tatsächlichen Stadium der Erkrankung oder dem Nervenzellverlust (Braak und Braak 1991; Braak et al. 1989). Das führte dazu, dass die Rolle von A β in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit fälschlicherweise vernachlässigt wurde.

Nachdem die Akkumulation von intrazellulärem A β in einer neuronalen Zelllinie nachgewiesen und die intrazelluläre Produktion von A β durch zahlreiche Experimente bestätigt worden waren, gewann die β -Amyloid-Hypothese in modifizierter Form wieder an Aktualität (Wertkin et al. 1993; Wild-Bode et al. 1997; Hartmann et al. 1997; Skovronsky et al. 1998). Es zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von A β_{42} in den Pyramidenzellen von beim

Morbus Alzheimer besonders durch Nervenzellverlust und Neurofibrillen-Ablagerung betroffenen Hirnregionen wie dem Hippocampus und dem entorhinalen Kortex (Gouras et al. 2000). Weitere Experimente ergaben zahlreiche Hinweise auf eine Korrelation zwischen intrazellulärem $A\beta_{42}$ und einem nachfolgenden Nervenzellverlust im Tiermodell (Casas et al. 2004; Schmitz et al. 2004; Christensen et al. 2008; Wirths et al. 2009; Bouter et al. 2013). Außerdem wurde gezeigt, dass intrazelluläres $A\beta$ zeitlich deutlich vor der Aggregation von Tau-Proteinen zu Neurofibrillen auftritt (Fernández-Vizarra et al. 2004). All diese Ergebnisse unterstützen die modifizierte Amyloid-Hypothese in der Annahme, dass die Akkumulation von intrazellulärem $A\beta$, insbesondere von $A\beta_{42}$, eines der frühesten pathologischen Ereignisse in der Entwicklung des Morbus Alzheimer darstellt und andere neuropathologische Veränderungen bedingt (Wirths et al. 2004).

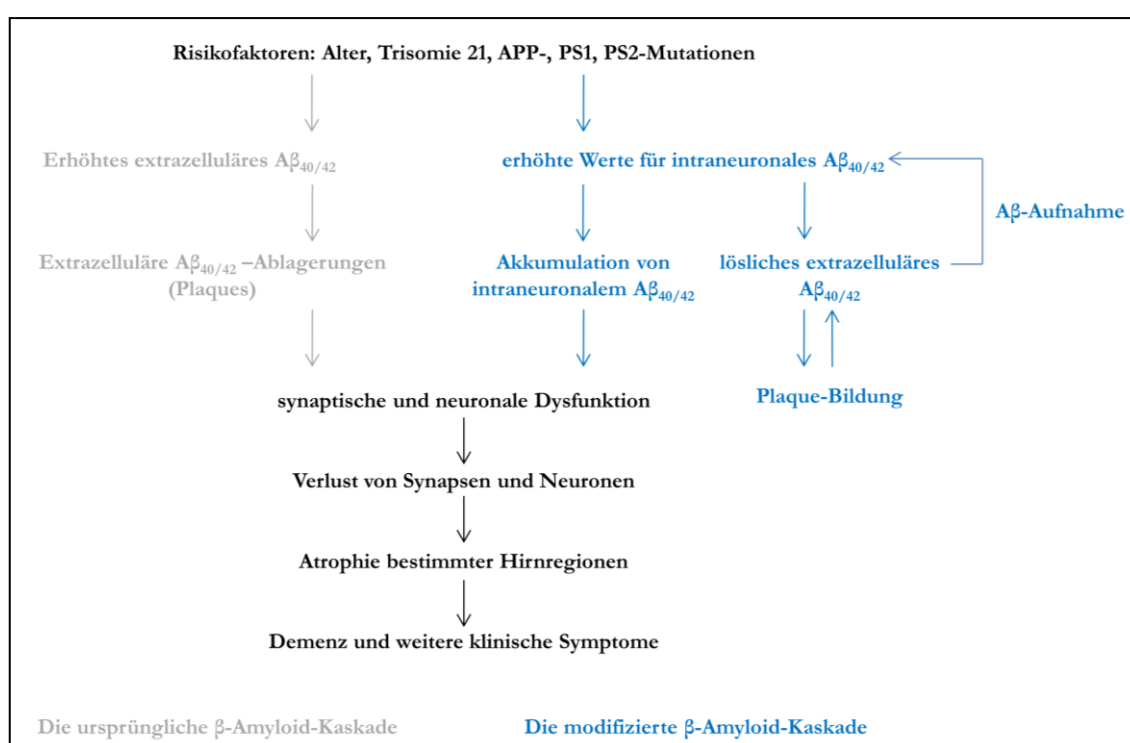


Abbildung 2: Die ursprüngliche und die modifizierte β -Amyloid-Kaskade.

Die ursprüngliche β -Amyloid-Hypothese (grau) stützte sich auf biochemische, neuropathologische, molekularbiologische und genetische Evidenz, während die modifizierte β -Amyloid-Hypothese (blau) auf neuen Erkenntnissen über die Rolle von intraneuralem $A\beta_{42}$ basiert. Demnach führen die beschriebenen Risikofaktoren zu erhöhten Werten für intraneuronales $A\beta_{42}$, das akkumuliert und die Degeneration von Synapsen und Neuronen bewirkt. Gleichzeitig induziert die erhöhte Sekretion von $A\beta_{42}$ extrazelluläre Ablagerungen (Plaques), die als dynamische Strukturen das $A\beta$ wieder freisetzen können. Dieses steht dann für die Wiederaufnahme in die Zelle zur Verfügung, was die intrazelluläre Toxizität erhöhen kann. Abbildung modifiziert nach Wirths et al. (2004), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung durch John Wiley and Sons.

1.4.3 Physiologische Eigenschaften von A β

A β entsteht physiologischerweise auch bei gesunden Menschen im normalen Metabolismus (Haass et al. 1992) und wird durch endogene Regulationsmechanismen in einer Balance mit seinem Abbau gehalten (Kamenetz et al. 2003; Zlokovic et al. 2005). Es wird intrazellulär synthetisiert und auf verschiedenen Wegen sezerniert. Die genauen Funktionen von A β im Stoffwechsel sind noch nicht hinreichend erforscht. Allerdings gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Bedeutung von A β in niedriger Konzentration für die synaptische Plastizität im ZNS (Puzzo et al. 2008), beispielsweise durch die Regulierung der NMDA und AMPA-Rezeptordichte oder die Steuerung der synaptischen Vesikel-Exozytose (Snyder et al. 2005; Hsieh et al. 2006; Abramov et al. 2009). Außerdem werden dem Beta-Amyloid im Stoffwechsel weitere Rollen wie antioxidative und antimikrobielle Eigenschaften sowie die Funktion als Transkriptionsfaktor zugeschrieben (Zou et al. 2002; Soscia et al. 2010; Bailey et al. 2011).

1.4.4 A β -Varianten

Wenn das Gleichgewicht aus Bildung und Abbau gestört wird, kann A β im Gehirn akkumulieren und Nervenzellen und Synapsen schädigen. Als Ursache für einen gestörten Abbau von A β kommen verschiedene Ursachen wie Enzymfehlfunktionen oder disregulierte Transportmechanismen sowie die Entstehung von A β -Isoformen mit veränderten Stoffwechseleigenschaften infrage (Iwata et al. 2005; Zlokovic et al. 2005). A β -Peptidvarianten unterscheiden sich in der Länge ihrer Aminosäuresequenz, die in der Regel aus 39 bis 43 Aminosäuren besteht (Mori et al. 1992). Das Verteilungsmuster dieser Subtypen unterscheidet sich nicht wesentlich bei sporadischen und familiären Alzheimer-Formen (Portelius et al. 2010).

Die C-terminale Heterogenität der A β -Varianten entsteht durch alternatives Prozessieren durch die γ -Sekretase, wobei hauptsächlich A $\beta_{40/42}$ -Varianten entstehen (Selkoe 1996). Diese werden intrazellulär in einem A β_{40} -zu-A β_{42} -Verhältnis von drei zu eins gebildet und in einem Verhältnis von 20 zu eins sezerniert (Masters et al. 1985a; Turner et al. 1996). Allerdings akkumulieren längere Peptide wie A β_{42} leichter als A β_{40} , was auf die höhere Lebensdauer, die geringere Löslichkeit, die Synthese in zellulären Kompartimenten ohne Sekretionsmöglichkeit sowie auf ein resultierendes höheres Aggregat-induzierendes Potenzial dieser längeren Varianten zurückzuführen ist (Skovronsky et al. 1998; Duyckaerts et al. 2009). Dadurch überwiegen intrazellulär A β_{42} -Varianten, während im sezernierten extrazellulären Pool viel A β_{40} vorkommt (Bayer et al. 2001). Bei einigen pathologischen Prozessen wie dem Morbus Alzheimer allerdings verschiebt sich das Verhältnis zugunsten von Carboxyterminal längeren A β -Varianten. So könnte extrazelluläres A $\beta_{42/43}$ der Startpunkt für die Entstehung von Amyloid-Plaques sein (Absatz 1.3.1).

N-Terminale Heterogenität entsteht zum einen durch eine Trunkierung am Amino-Terminus von A β aufgrund von divergierender enzymatischer Aktivität an verschiedenen Stellen des Peptids (Bayer und Wirths 2014), zum anderen durch darauf folgende Modifizierungen wie Racemisierung (Mori et al. 1994), Isomerisierung (Kuo et al. 1998), Phosphorylierung (Kumar et al. 2011), Nitrierung (Kummer et al. 2011) und Pyroglutamylobildung. Nach Sergeant et al. (2003) ist im Gehirn von Alzheimer-Patienten insgesamt über 60% des Beta-Amyloids N-terminal trunkiert, interessanterweise auch bereits im Frühstadium. Portelius et al. (2010) beschreiben die A β -Varianten A β_{pE3-42} und A β_{4-42} als dominante Fraktionen der Amyloid-Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten.

Einige N-terminale Veränderungen führen ähnlich wie C-terminale Abweichungen zu besonderen Eigenschaften der entstehenden Peptide, die besonders im Falle von A β_{pE3-42} und A β_{4-42} möglicherweise wesentlich zur Pathogenese beitragen (Absatz 1.4.4.1).

1.4.4.1 A β_{4-42} und A β_{pE3-42}

A β_{4-42} und A β_{pE3-42} sind neben A β_{1-40} und A β_{1-42} die häufigsten Isoformen von A β im Gehirn von Alzheimer-Patienten und bilden die dominante Fraktion der Ablagerungen im Hippocampus und im Kortex (Portelius et al. 2010). Beide zeigen eine erhöhte Toxizität auf Nervenzellen mit konsekutivem Neuronenverlust sowie eine für N-terminal trunkierte A β -Isoformen typische erhöhte Aggregationsneigung, die zu einer gesteigerten Stabilität der Peptide bzw. der Oligomere führt und deren Abbau dadurch deutlich erschwert (Pike et al. 1995). Nach Bouter et al. (2013) zeigen A β_{4-42} und A β_{pE3-42} unter den getesteten A β -Varianten gefolgt von A β_{1-42} , A β_{4-40} und A β_{4-38} die höchste Aggregationsneigung und gemeinsam mit A β_{1-42} die höchste Toxizität *in vitro*. Des Weiteren induzieren A β_{4-42} , A β_{pE3-42} und A β_{1-42} bei intraventrikulärer Injektion Defizite im Arbeitsgedächtnis von Wildtyp-Mäusen und entfalten somit auch *in vivo* ihre Toxizität (Bouter et al. 2013).

Das A β_{4-42} -Peptid, das am Amino-Terminus mit Phenylalanin an der vierten Position beginnt, wurde 1985 im Gehirn von Alzheimer-Patienten entdeckt, wo es einen Anteil von 64% am gesamten A β von Amyloid-Plaques ausmachte (Masters et al. 1985b). Lewis et al. (2006) bestätigen das abundante Auftreten von A β_{4-42} im Gehirn von Patienten mit Morbus Alzheimer oder vaskulärer Demenz und auch Portelius et al. (2010) unterstreichen diese Resultate. Das verantwortliche Enzym für die Trunkierung an Position vier ist bis heute nicht bekannt. Neben der bereits erwähnten Aggregationsneigung und Toxizität auf Nervenzellen verursacht die chronische Belastung mit A β_{4-42} bei transgenen Tg4-42-Mäusen einen progressiven Nervenzellverlust im Hippocampus, einhergehend mit deutlichen Beeinträchtigungen des Lernverhaltens (Bouter et al. 2013). Darüber hinaus tritt intrazelluläres A β_{4-42} im Gehirn von transgenen 5xFAD-Mäusen zeitlich gesehen vor anderen Isoformen auf und ist als Unterform der A β_{42} -Varianten bei Menschen mit Trisomie 21 bereits im Alter von 3-4 Jahren nachweisbar (Mori et al. 2002; Antonios et al. 2013). A β_{4-42} stellt in der

Zusammenschau all dieser Eigenschaften ein gutes Ziel für eine Immuntherapie dar (Bayer und Wirths 2014).

Das $A\beta_{pE3-42}$ -Peptid beginnt am Amino-Terminus mit Pyroglutamat an der dritten Position. Es wurde 1992 erstmals mittels Massenspektrometrie nachgewiesen und mit einem Anteil von etwa 15 bis 20% als eine untergeordnete $A\beta$ -Fraktion im Gehirn von Alzheimer-Patienten bezeichnet (Mori et al. 1992). Später wurde diese Auffassung mit dem Nachweis von $A\beta_{pE3-42}$ als eine der dominanten $A\beta$ -Fraktionen beim Morbus Alzheimer revidiert (Saido et al. 1995; Wirths et al. 2010a). Bei der Entstehung von $A\beta_{pE3-42}$ ist das Enzym Glutaminylylzyklase für die Umwandlung von Glutamat oder Glutamin in Pyroglutamat zuständig (Jawhar et al. 2011). Ähnlich wie bei $A\beta_{4-42}$ zeigen sich auch hier deutliche Effekte im transgenen Tiermodell, die die angesprochene erhöhte Aggregationsneigung und Toxizität *in vivo* unterstreichen. So kommt es bei TBA2-Mäusen zu einer selektiven Expression und intraneuronalen Akkumulation von $A\beta_{pE3-42}$ -Peptiden mit konsekutiver Neurodegeneration, die mit deutlichen phänotypischen und motorisch betonten Beeinträchtigungen assoziiert ist (Wirths et al. 2009).

1.4.5 $A\beta$ -Aggregation

Vor dem Hintergrund der in Absatz 1.4.4.1 beschriebenen Erkenntnisse liegt die Hypothese nahe, dass die Bildung löslicher Aggregate aus $A\beta_{4-42}$ und $A\beta_{pE3-42}$ eines der frühesten und wichtigsten Ereignisse in der Pathogenese des Morbus Alzheimers darstellt. Als Erweiterung der modifizierten Amyloid-Hypothese (Absatz 1.4.2) könnten sich lösliche $A\beta$ -Oligomere somit als Hauptauslöser der Krankheit erweisen (Benilova et al. 2012).

Während der Zusammenlagerung von $A\beta$ -Peptiden verbinden sich Monomere zunächst zu Dimeren, Trimeren und höhermolekularen Aggregaten, die in ihrem prä-fibrillären Zustand als lösliche Oligomere vorliegen (Walsh und Selkoe 2007). Wenn diese weiter aggregieren, können sie $A\beta$ -Fibrillen bilden, die sich dann als Plaques ablagern (Hu et al. 2009; Kumar et al. 2011). Lösliche $A\beta$ -Oligomere zeigen im Gegensatz zu Plaques eine gute Korrelation mit dem Krankheitsverlauf und dem Verlust von Synapsen (McLean et al. 1999; Lue et al. 1999; Bayer und Wirths 2010). Sie können die synaptische Plastizität und die Langzeitpotenzierung *in vitro* und *in vivo* nachhaltig schädigen und wirken damit als direkte Auslöser kognitiver Beeinträchtigungen (Walsh et al. 2002; Cleary et al. 2005; Li et al. 2009).

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse stellen lösliche $A\beta$ -Oligomere ein gutes Ziel für Interventionen durch verschiedene Therapieansätze dar.

1.5 Genetik

Der seltenen autosomal-dominant vererbten familiären Form des Morbus Alzheimer liegen in der Regel Mutationen in drei verschiedenen Genen zugrunde. Dabei handelt es sich um

die für den A β -Stoffwechsel wichtigen Gene für APP auf dem Chromosom 21, für PS1 auf dem Chromosom 14 und für PS2 auf dem Chromosom 1. Patienten mit FAD erkranken deutlich früher und die Symptome sind schneller progredient als bei der sporadischen Form.

Es sind 52 pathogene Mutationen bekannt, die das APP-Gen betreffen (Cacace et al. 2016). Dieses ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert, was die enge Verknüpfung zwischen dem Morbus Alzheimer und der Trisomie 21 erklärt (Mori et al. 2002; Lott und Head 2005). Erste Hinweise auf eine genetische Ursache für den Morbus Alzheimer lieferte die Entdeckung der sogenannten *London Mutation* im APP-Gen (Goate et al. 1991). Seitdem wurden viele weitere Mutationen entdeckt, von denen die meisten in der Nähe der Schnittstellen für die bei der Prozessierung beteiligten Enzyme liegen. Ist die Schnittstelle der β -Sekretase betroffen, kommt es zu einem allgemeinen Anstieg von A β (Cai et al. 1993; Haass et al. 1994). Mutationen in der Nähe der γ -Sekretase-Schnittstelle, wie bei der *London Mutation*, verursachen hingegen eher eine Verschiebung des A β_{42} /A β_{40} -Verhältnisses zugunsten des leichter aggregierenden A β_{42} (Suzuki et al. 1994a). Darüber hinaus können Mutationen innerhalb der A β -Region von APP zu veränderten Eigenschaften der entstehenden Peptide führen und so beispielsweise deren Aggregationswahrscheinlichkeit und Stabilität erhöhen (Haass et al. 1994; Brouwers et al. 2008). Daneben ist mit der A673T-Mutation auch bereits eine protektive Mutation im APP-Gen gegen die Entstehung des Morbus Alzheimer bekannt (Jonsson et al. 2012).

PS1 und PS2 kodieren für das katalytische Zentrum der γ -Sekretase, die bei der APP-Prozessierung das Carboxy-terminale Ende von A β generiert (Absatz 1.4.1.2). Mutationen im PS1-Gen sind mit einer Anzahl von 215 die häufigsten Ursachen für die FAD-Entwicklung und können ähnlich wie die 15 bekannten PS2-Mutationen ebenfalls zu einer relativen Erhöhung von A β_{42} im Verhältnis zu A β_{40} führen (Borchelt et al. 1996; Citron et al. 1997; Kumar-Singh et al. 2006; Cacace et al. 2016). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Mutationen im PS1-Gen auch eine erhöhte Produktion von N-terminal modifizierten A β -Varianten wie dem äußerst toxischen A β_{pE3-42} hervorrufen können (Russo et al. 2000)

Der häufigeren sporadischen Form des Morbus Alzheimer liegen keine bekannten Mutationen zugrunde und man geht von einer multifaktoriellen Genese der Erkrankung aus. Allerdings gibt es genetische Polymorphismen, die das Erkrankungsrisiko erhöhen. Wahrscheinlich sind über 50% der sporadischen Alzheimer-Fälle genetisch bedingt (Gatz et al. 2006; Wilson et al. 2011). Dabei ist der bei weitem bedeutsamste genetische Risikofaktor das Gen für das Apolipoprotein E (ApoE), das gehäuft im ZNS exprimiert wird und Funktionen im Fettstoffwechsel erfüllt (Strittmatter et al. 1993; Raber et al. 2004). Außerdem ist es am Abbau von A β beteiligt (Jiang et al. 2008). Es gibt die drei ApoE-Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, von denen ApoE $\epsilon 4$ einen Risikofaktor für die Entwicklung und das frühe Auftreten der Alzheimer-Krankheit darstellt, während ApoE $\epsilon 2$ protektiv wirkt (Corder et al. 1993; Holtzman et al. 2011). Dabei erhöht das ApoE $\epsilon 4$ -Allel das Erkrankungsrisiko bei heterozygoten

Trägern um das Dreifache und bei Homozygoten um den Faktor 15 (Farrer et al. 1997; Blennow et al. 2006). Neben dem ApoE-Gen ist für eine Reihe weiterer Gene eine Assoziation mit dem Morbus Alzheimer festgestellt worden, was weiterer genetischer Forschung bedarf (Lambert et al. 2013).

1.6 Mausmodelle für den Morbus Alzheimer

Die Generierung von Mausmodellen für den Morbus Alzheimer ist immer ein Kompromiss, da keines der Modelle das gesamte neuropathologische Spektrum der Krankheit simulieren kann. Daher gibt es diverse Modelle für die vielfältigen Komponenten der Erkrankung, die einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese sowie zu Einsatzmöglichkeiten verschiedener therapeutischer Substanzen leisten.

Bei der Erstellung transgener Mausmodelle werden in der Regel verschiedene FAD-Gene verwendet. So gibt es eine große Gruppe transgener APP-Tiermodelle (Games et al. 1995; Hsiao et al. 1996) und daneben auch transgene Präsenilin-Modelle (Duff et al. 1996; Guo et al. 1999). Um eine ausgeprägtere, vielfältigere und schneller auftretende Pathologie in den Tiermodellen zu erzeugen, können mehrere Transgene in einem Tiermodell vereinigt werden. Dabei handelt es sich beispielsweise um mehrere mutierte APP-Gene (Sturchler-Pierrat et al. 1997; Chishti et al. 2001) oder Kombinationen aus APP- und PS1-Genen (Blanchard et al. 2003). Auf diese Weise entstanden unter anderem dreifach-transgene Modelle wie die 3xTg-Mauslinie (Oddo et al. 2003), vierfach transgene Tiere wie APP/PS1KI-Mäuse (Casas et al. 2004) und sogar fünffach-transgene Mausmodelle wie die 5xFAD-Linie, die ein breites Spektrum an Pathologien abdecken. So koexprimieren 5xFAD-Mäuse fünf verschiedene APP- und PS1-Mutationen aus der FAD-Genfamilie und zeigen eine schnelle und massive zerebrale intra- und extrazelluläre Akkumulation von überwiegend $A\beta_{42}$ -Varianten (Oakley et al. 2006). Insgesamt werden bei diesen Mäusen die Isomere $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{3-42}$, $A\beta_{4-42}$, $A\beta_{5-42}$, $A\beta_{pE3-40}$ und $A\beta_{pE3-42}$ exprimiert (Witnam et al. 2012). Tiere aus dem 5xFAD-Mausmodell entwickeln neben Defiziten im Arbeitsgedächtnis und einem reduzierten Angstempfinden auch eine beeinträchtigte Motorik. Sie zeigen eine gesteigerte Ansammlung von intrazellulärem $A\beta$, ausgeprägte extrazelluläre Amyloid-Plaques und einen signifikanten Nervenzellverlust in der neokortikalen Lamina V, nicht jedoch in anderen Hirnregionen wie der CA1-Region des Hippocampus (Jawhar et al. 2012). Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese eines Kausalzusammenhangs zwischen intraneuronaler Akkumulation von $A\beta$ und dem Untergang von Nervenzellen (Wirhns und Bayer 2010).

Trotz dieses breiten Spektrums an Pathologien bilden nur wenige Modelle den für den Verlauf der Alzheimer-Krankheit essenziellen Neuronenverlust adäquat ab (Wirhns und Bayer 2010). Außerdem generieren zwar einige dieser Mausmodelle auch N-terminal trunkierte $A\beta$ -Peptide, jedoch in einer geringen Konzentration, die die Rolle dieser $A\beta$ -Varianten im Gehirn von Alzheimer-Patienten nicht adäquat widerspiegelt (Bayer und Wirhns 2014).

Da diese trunkeierten Peptide jedoch möglicherweise zu den hauptverantwortlichen Komponenten der Alzheimer-Pathogenese zählen (Benilova et al. 2012), wurden Mausmodelle entwickelt, die selektiv bestimmte N-terminal veränderte A β -Varianten in hoher Konzentration exprimieren. So entstand beispielsweise das TBA42-Mausmodell, bei dem es zu einer zerebralen Akkumulation von A $\beta_{\text{pE3-42}}$ und altersabhängigen Verhaltensdefiziten kommt (Wittnam et al. 2012), sowie das Tg4-42-Mausmodell für die Isoform A β_{4-42} (Absatz 1.6.1).

1.6.1 Tg4-42-Mausmodell

Tg4-42-Mäuse haben den genetischen Hintergrund der C57BL/6J-Linie. Sie tragen ein Transgen, das unter der Kontrolle des neuronalen Thy-1 Promotors humanes A β_{4-42} exprimiert, das an das murine prä-pro-TRH gebunden ist (Bouter et al. 2013). Der prä-pro-TRH-Anteil führt das so entstandene Fusionspeptid durch den neuronalen Sekretionsweg und wird schließlich enzymatisch abgespalten, sodass A β_{4-42} freigesetzt wird (Wittnam 2012; Bouter 2014), (Abbildung 3). Auf diese Weise lassen sich toxische Effekte von A β_{4-42} als eine der häufigsten Isoformen von A β im Gehirn von Alzheimer-Patienten selektiv untersuchen, ohne dass auf ein mutiertes Gen aus der FAD-Genfamilie zurückgegriffen werden muss.

Bei Tg4-42-Mäusen ist intrazelluläres A β außer im Hippocampus auch in anderen Hirnregionen wie dem Striatum, dem okzipitalen und piriformen Kortex sowie im Colliculus superior zu finden. Außerdem ist im Hippocampus eine begleitende Gliose aus Astro- und Mikroglia festzustellen, während extrazelluläres A β in Form von Plaques in diesem Modell fehlt (Bouter et al. 2013; Bouter et al. 2014).

Tg4-42-Mäuse entwickeln einen schweren Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus, der Beeinträchtigungen im räumlichen Bezugsgedächtnis hervorruft (Bouter et al. 2013).

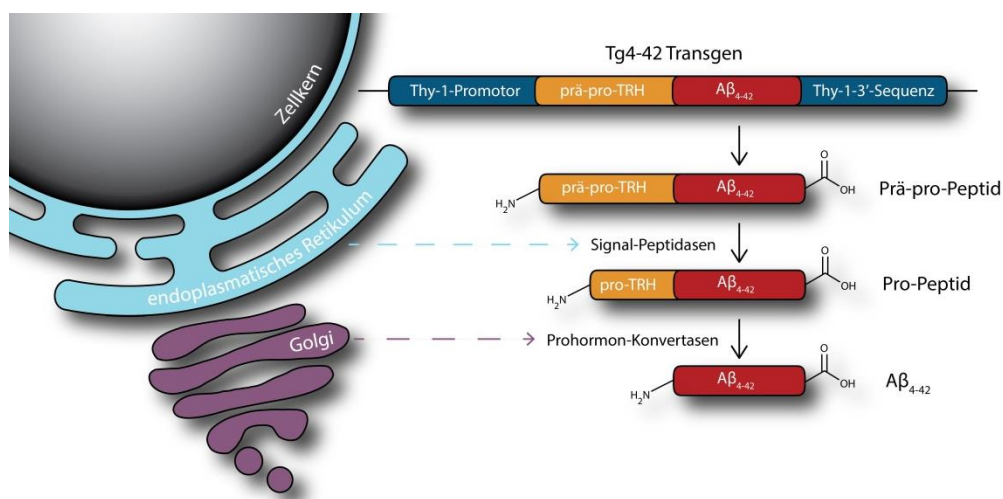


Abbildung 3: Das Transgen bei der Tg4-42-Mauslinie.

Die Expression des Prä-pro-TRH-Aβ₄₋₄₂-Fusionspeptids wird durch den murinen Thy-1-Promotor reguliert. Der Amino-Terminus steuert das Peptid durch den neuronalen Sekretionsweg und wird mehrfach modifiziert. Zunächst prozessieren Signalpeptidasen im endoplasmatischen Retikulum das Prä-pro-Peptid zum Pro-Peptid, das daraufhin im trans-Golgi-Netzwerk sowie in den sekretorischen Vesikeln durch Prohormon-Konvertasen von seinem TRH-Anteil befreit wird. Das fertige Aβ₄₋₄₂ kann nun aus der Zelle freigegeben werden. Abbildung modifiziert nach Bouter (2014), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Autorin.

1.7 Neue Therapieansätze

Derzeit konzentriert sich ein großer Teil der Forschung auf dem Gebiet des Morbus Alzheimer auf die Antikörpertherapie, die sich in die aktive und die passive Immunisierung aufspaltet (Absätze 1.7.1 und 1.7.2). Allerdings werden auch vielfältige alternative Therapieansätze diskutiert (Absatz 1.7.3).

1.7.1 Aktive Immunisierung

Die aktive Immunisierung mit Aβ wurde erstmals 1999 erfolgreich bei transgenen PDAPP-Mäusen durchgeführt (Schenk et al. 1999) und hat seither in zahlreichen Tiermodellen vielversprechende Resultate erzielt. Die Ergebnisse aus den Tiermodellen konnten jedoch nicht die genauen immunologischen Wirkungen beim Menschen vorhersagen, was bei einigen Patienten in einer klinischen Studie beispielsweise zu der Entwicklung einer Meningoenzephalitis führte (Gilman et al. 2005; Spencer und Masliah 2014). Daraufhin wurde die Studie beendet und die Forschung an Therapiemöglichkeiten von aktiver Immunisierung mit Aβ stark eingeschränkt, obwohl bei den behandelten Patienten nach der späteren Obduktion positive Effekte auf neuronale und Tau-assoziierte Pathologien erkennbar waren (Serrano-Pozo et al. 2010).

1.7.2 Passive Immunisierung

Die passive Immunisierung zeigt in dieser Hinsicht einige Vorteile. Verschiedene Antikörper wurden bereits in klinischen Studien getestet, darunter Solanezumab, Crenezumab, Bapineuzumab und Aducanumab. Daneben befinden sich einige vielversprechende Antikörper gegen N-terminal trunkierte A β -Varianten, darunter der NT4X-Antikörper, in der präklinischen Erprobung.

1.7.2.1 Solanezumab, Crenezumab und Bapineuzumab

Solanezumab, Crenezumab und Bapineuzumab sind humanisierte Antikörper, die alle sowohl an A β in Plaques und CAA als auch an intraneurales A β binden. Allerdings erkennt Bapineuzumab im Gegensatz zu den anderen beiden keine N-terminal trunkierten bzw. modifizierten A β -Varianten (Bouter et al. 2015).

Bapineuzumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von A β , ist der einzige bekannte Antikörper, der bei Patienten nachweislich die Amyloid-Belastung sowie die Menge an Tau bzw. Phospho-Tau im Liquor cerebrospinalis reduziert (Rinne et al. 2010; Bouter et al. 2015). Als erster in klinischen Studien analysierter Antikörper konnte Bapineuzumab allerdings in zwei großangelegten Phase-3-Studien bei Patienten mit leicht bis mittelschwer ausgeprägtem Morbus Alzheimer keine signifikant verbesserten klinischen Ergebnisse erzielen (Salloway et al. 2014). Außerdem war bei den mit Bapineuzumab behandelten Patienten ein höheres Risiko für die Entwicklung eines vasogenen Hirnödems feststellbar (Sperling et al. 2012). Die US-amerikanischen Pharmakonzerne Pfizer und Johnson & Johnson stoppten daraufhin die Entwicklung.

Stattdessen befinden sich derzeit die dem Bapineuzumab strukturverwandten Antikörper Solanezumab des Pharmaunternehmens Eli Lilly and Company aus den USA sowie Crenezumab von Genentech, einem Biotechnologieunternehmen der schweizerischen Hoffmann-La Roche AG, in der klinischen Erprobung (Crespi et al. 2015). Beide sind gegen die mittlere Region von A β gerichtet (Legleiter et al. 2004; Adolfsson et al. 2012). Während Solanezumab eher an lösliches A β bindet, zeigt Crenezumab eine höhere Affinität für die Bindung von fibrillärem A β (Seubert et al. 2008; Adolfsson et al. 2012; Bouter et al. 2015). Solanezumab konnte in ersten klinischen Studien einen positiven Einfluss auf die kognitiven und funktionellen Fähigkeiten von Patienten in frühen Stadien erzielen, der in späteren Stadien jedoch nicht mehr erkennbar war (Doody et al. 2014). Ähnliche Effekte wurden durch Crenezumab in Phase-2-Studien beobachtet (Selkoe und Hardy 2016).

1.7.2.2 Aducanumab

Im Gegensatz zu den humanisierten Antikörpern ist Aducanumab ein humaner Antikörper, der von dem US-amerikanischen Biotechnologie-Unternehmen Biogen entwickelt wurde und an Plaques und A β -Oligomere, nicht jedoch an A β -Monomere bindet (Selkoe und Hardy 2016). Er konnte in einer Phase-1b-Studie in der Positronenemissionstomogra-

phie (PET) eine deutliche Reduktion des Beta-Amyloids im Gehirn erreichen und den kognitiven Verfall nahezu aufhalten. Derzeit befindet sich Aducanumab in der klinischen Phase-3-Erprobung (Sevigny et al. 2015; Selkoe und Hardy 2016).

1.7.2.3 NT4X

N-terminal trunke und modifizierte A β -Varianten treten im Gehirn in hoher Konzentration auch bereits in frühen Stadien der Alzheimer-Krankheit auf und stellen damit möglicherweise bessere Ziele für die Antikörpertherapie dar als A $\beta_{1-40/42}$ (Bayer und Wirths 2014; Bouter et al. 2015). Daher wurden verschiedene Antikörper gegen diese A β -Isoformen generiert, die sich derzeit noch nicht in der klinischen Erprobung am Menschen befinden. Der Antikörper 1-57 detektiert beispielsweise bei APP/PS1KI-Mäusen pan-A β_{pE3-x} aus Plaques (Wirths et al. 2010a). Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist NT4X.

NT4X ist ein muriner monoklonaler IgG2b-Antikörper, der an den Amino-Terminus von oligomerem N-terminal trunke A $\beta_{4-40/42}$ und A $\beta_{pE3-40/42}$ bindet, nicht jedoch an A $\beta_{1-40/42}$ -Proteinvarianten (Antonios et al. 2013). Dieses Bindungsprofil wurde mittels biophysikalischer Methoden zur Messung der Assoziations- und Dissoziationskinetik zwischen NT4X und den A β -Varianten A β_{pE3-42} , A β_{4-42} bzw. A β_{1-42} bestätigt und deckt sich mit der Verminderung der Toxizität von oligomerem A β_{4-42} und A β_{pE3-42} durch NT4X *in vitro* (Antonios et al. 2015). Als Epitop von NT4X lässt sich im ELISA-Verfahren N-terminal trunke A β_{2-4} und hierbei das stärkste Signal für A β_{4-x} mit der Aminosäure Phenylalanin an Position vier nachweisen (Antonios et al. 2013). Diese Konstellation ist unter anderem bei dem von transgenen Tg4-42-Mäusen selektiv exprimierten A β_{4-42} vorhanden (Absatz 1.6.1). Im 5xFAD-Mausmodell erkennt der NT4X-Antikörper frühe intraneuronale Ansammlungen von A β_{4-x} . Darüber hinaus zeigt er bei schwacher Affinität zu Plaque-gebundenen A β -Fibrillen eine hohe Affinität zu löslichen A β -Oligomeren und weist keine Kreuzreaktivität mit zerebralen Proteinablagerungen anderer neurodegenerativer Erkrankungen auf (Antonios et al. 2013).

1.7.3 Weitere Therapieansätze

Neben der Therapie mit Antikörpern wird auch nach alternativen Behandlungsmethoden und nach neuen Substanzen als Therapeutika gegen den Morbus Alzheimer gesucht.

So gibt es Ansätze für die Etablierung von β - und γ -Sekretasehemmern, die in den Beta-Amyloid-Stoffwechsel eingreifen und so die Akkumulation toxischer A β -Varianten verhindern sollen. Aufgrund der vielen verschiedenen Substrate und damit schwer einzuschätzenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen gelangte bisher nur der γ -Sekretaseinhibitor Semagacestat in eine Phase-3-Studie, die jedoch aufgrund unerwünschter Arzneimittelwirkungen abgebrochen werden musste (Doody et al. 2013). Allerdings sind derzeit verschiedene klinische Studien mit β -Sekretasehemmern geplant (Selkoe und Hardy 2016).

Des Weiteren wurde kürzlich ein protektiver Effekt von dauerhafter körperlicher Betätigung und kognitiver Stimulation auf den Nervenzellverlust im Tg4-42-Mausmodell beschrieben (Hüttenrauch et al. 2016). Dies weist ebenso wie zahlreiche weitere Studien auf einen präventiven und therapeutischen Nutzen von körperlicher Aktivität für die Entstehung und den Verlauf der Alzheimer-Krankheit hin und unterstreicht damit die Bedeutung von Bewegungsmanagement und kognitivem Training in der Behandlung betroffener Patienten.

Darüber hinaus befinden sich derzeit zahlreiche weitere Substanzen und Methoden zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit in verschiedenen Stadien der Entwicklung, von denen einige bereits vielversprechende Resultate erzielt haben.

1.8 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Das $A\beta_{4-42}$ -Peptid ist eine der am frühesten auftretenden N-terminal trunkierten $A\beta$ -Varianten im Gehirn von Alzheimer-Patienten und dort im Krankheitsverlauf in hoher Konzentration nachzuweisen. Es wirkt *in vitro* toxisch auf Nervenzellen und ruft *in vivo* bei transgenen Tg4-42-Mäusen einen Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus sowie schwere Defizite im Lernverhalten hervor (Absätze 1.4.4.1 und 1.6.1). Der NT4X-Antikörper vermindert *in vitro* den toxischen Effekt von $A\beta_{4-42}$ und erkennt die frühe intraneuronale Akkumulation von $A\beta_{4-x}$ in 5xFAD-Mäusen (Absatz 1.7.2.3).

In dieser Arbeit geht es daher um die Untersuchung möglicher protektiver Eigenschaften von NT4X auf Nervenzellverlust und Verhaltensdefizite *in vivo* bei homozygoten Tg4-42-Mäusen (Tg4-42_{hom}).

Dafür muss zunächst der optimale Zeitpunkt für den Beginn einer passiven Immunisierung ermittelt werden. Dieser wird mithilfe von Verhaltenstests sowie der Quantifizierung der Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus von unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäusen festgestellt.

Anschließend werden die Tg4-42_{hom}-Mäuse über einen Zeitraum von 12 Wochen mit NT4X behandelt und die resultierenden Effekte analysiert. Dafür werden bei den behandelten Tieren ebenfalls das Verhalten und die Nervenzellzahl bewertet. Wenn der NT4X-Antikörper auch *in vivo* einen protektiven Effekt gegen die Toxizität von $A\beta_{4-42}$ bietet, spräche das für die grundsätzliche Eignung dieses Peptids als Angriffspunkt einer Antikörpertherapie und für NT4X als potenzielles Arzneimittel in der Behandlung des Morbus Alzheimer beim Menschen.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere gehörten allesamt der Spezies Hausmaus (*Mus musculus*) an. Sie wurden nach den Vorgaben der „Gesellschaft für Versuchstierkunde“ (GV-SOLAS) und der „Federation of European Laboratory Animal Science Associations“ (FELASA) behandelt. Alle Tierexperimente wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt und von hierfür ausgebildeten Personen durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde die Anzahl der verwendeten Tiere so klein wie möglich gehalten. Außerdem wurden Schmerzen, Leiden und Schäden nach Möglichkeit vermieden bzw. minimiert.

2.1.1 Haltungsbedingungen

Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) verpaart, ausgetragen und gehalten. In der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) wurden die Mäuse nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von bis zu sechs Tieren in einzelbelüfteten IVC-Käfigen mit den Abmessungen 32 cm Länge x 15 cm Breite x 14,5 cm Höhe gehalten. Sowohl Wasser als auch Futter waren frei verfügbar.

Für die Phänotypisierung im Labor wurden die Mäuse in einen dort vorhandenen Schrank für die Haltung von Versuchstieren (Charles River Laboratories, Washington, MA, USA) überführt, wo der mit 12/12 Stunden festgelegte Tag-Nacht-Rhythmus der Mäuse umgekehrt wurde, um die Verhaltensexperimente und Motortests in der wachen Phase der Tiere durchführen zu können. Ansonsten unterschieden sich die Haltungsbedingungen nicht von denen in der ZTE.

2.1.2 Transgene Tg4-42_{hom}-Mauslinie

Es wurden in dieser Arbeit ausschließlich Mäuse der transgenen Tg4-42_{hom}-Linie verwendet (Absatz 1.6.1). Tg4-42_{hom}-Mäuse sind homozygot für ein Transgen, welches das Prä-pro-TRH-A β ₄₋₄₂-Fusionspeptid exprimiert. Dieses wiederum gibt nach mehrfacher Prozessierung lösliches A β ₄₋₄₂ frei (Bouter et al. 2013). Bei der Tg4-42-Linie handelt es sich somit um ein Mausmodell, bei dem ausschließlich das N-terminal trunkierte A β ₄₋₄₂ und keine weiteren A β -Varianten exprimiert wird. Durch die Verwendung dieses Modells wurden damit eine spezifische Untersuchung der Folgen chronischer A β ₄₋₄₂-Belastung sowie die Evaluierung möglicher Therapieeffekte einer passiven Immunisierung mit NT4X ermöglicht.

2.1.2.1 Benennung der Tg4-42_{hom}-Gruppen nach Alter

Die Einteilung der Mäuse in Altersgruppen orientierte sich in allen durchgeführten Tests an dem auf ganze Monate gerundeten Todeszeitpunkt der Tiere.

Demnach sind die Mäuse beispielsweise beim Start der Verhaltenstests (Absatz 2.3) noch etwa 15 Tage jünger, als es die Gruppenbezeichnung vermuten ließe (Abbildung 16). Für eine bessere Übersicht im Vergleich mit den *post mortem* durchgeführten Versuchen erfolgte die Benennung der Gruppen jedoch einheitlich nach dem oben genannten Schema.

2.1.3 Nachweis des Transgens bei Tg4-42_{hom}-Mäusen

Um die Zugehörigkeit der in dieser Arbeit verwendeten Mäuse zur transgenen Tg4-42-Linie zu sichern, wurde stichprobenartig anhand von aus Schwanzbiopsien isolierter DNA das Transgen nachgewiesen. Dafür wurden die entsprechenden Genabschnitte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und mithilfe einer Gelelektrophorese analysiert.

2.1.3.1 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

Zunächst wurden in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß 400 µl Lysepuffer [100 mM Tris/HCl pH8,5 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 5 mM EDTA (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), 0,2% Natriumdodecylsulfat (SDS, Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland), 200 mM NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)] mit 5 µl Proteinase K [20 mg/ml in wässriger Lösung, Peqlab GmbH (heute VWR Life Science Competence Center), Erlangen, Deutschland] versetzt. Dann wurde das Gewebe hinzugegeben und für etwa 20 Stunden bei 55 °C im Thermomixer Compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 300 U/min lysiert. Die Probe wurde für 20 Minuten bei 17.000 U/min und 4 °C abzentrifugiert (Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit 400 µl 4 °C kaltem Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf dem Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) vermischt, bis ein Präzipitat sichtbar war. Danach wurde die Probe für 10 Minuten bei 13.000 U/min erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol (Walter-CMP, Kiel, Deutschland) gewaschen und wieder für 10 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Ethanolreste abpipettiert und das Pellet für eine Stunde bei 55 °C auf dem UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 55 µl Reinstwasser (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst, für 30 Minuten bei 55 °C im Thermomixer inkubiert und über Nacht bei 4 °C gelagert.

2.1.3.2 Nukleinsäure-Quantifizierung

Für den Einsatz in der PCR wurden die Konzentrationen der Nukleinsäuren in einem Bio-Photometer D30 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) quantifiziert. Jeweils 2 µl der wie in Absatz 2.1.3.1 beschrieben hergestellten Proben wurden mit 78 µl Reinstwasser

(B. Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt und jeweils in eine UVette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Als Negativprobe wurden 80 µl Reinstwasser verwendet. Bei einem Extinktionskoeffizienten von über 1,8 für A260/A280 und A260/A230 wurde von einer ausreichenden Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren ausgegangen. Daraufhin wurden Probenverdünnungen von 20 ng/µl hergestellt.

2.1.3.3 Nukleinsäure-Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden in 0,2-µl-PCR-Gefäße (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) jeweils 2 µl der DNA-Probenverdünnungen (Absatz 2.1.3.2) mit 18 µl eines PCR-Mastermixes [10,2 µl Aqua bidestillata (Aqua bidest.), 2 µl 10x Reaktionspuffer (Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland), 1,6 µl 25 mM MgCl₂ (Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland), 2 µl dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, jetzt Thermo Fisher Scientific), 1 µl Primer 1 Aβ₃₋₄₂ for2 (5′3′-Sequenz GTGACTCCTGACCTTCCAG), 1 µl Primer 2 Aβ₃₋₄₂ rev2 (5′3′-Sequenz GTTACGCTATGACAACACC) (beide Primer: Eurofins Medigenomix Forensik GmbH, Ebersberg, Deutschland), 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland)] gegeben. Daraufhin wurden die DNA-Proben nach dem in Tabelle 1 dargestellten Protokoll in einem LabCycler (SensQQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) amplifiziert.

Tabelle 1: PCR-Protokoll der Temperaturzyklen

Schritt	Dauer	Temperatur
1.	3 Minuten	94 °C
2.	45 Sekunden	94 °C
3.	1 Minute	58 °C
4.	1 Minute	72 °C
5.	35 Mal Schritte 2-4 wiederholen	
6.	5 Minuten	72 °C
7.	Kein Zeitlimit	4 °C

2.1.3.4 Gel-Elektrophorese

Für die elektrophoretische Differenzierung der Nukleinsäuren wurde ein Agarose-Gel hergestellt. Dafür wurde zunächst 10x TBE-Puffer [108 g Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 55 g Borsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 900 ml Aqua bidest., 40 ml 0,5 M Na₂EDTA pH 8.0 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), aufgefüllt mit Aqua bidest. auf 1 Liter] mit bidestilliertem Wasser auf 1x TBE-Puffer verdünnt. Dann wurden 200 ml des 1x TBE-Puffers mit 4 g Agarose (Lonza Group AG, Basel, Schweiz) in der Mikrowelle aufgekocht und danach mit 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Die so entstandene Lösung wurde in eine Gießschale gegossen und mit zwei Probenkämme für jeweils 20 Probenkammern versehen. Möglicherweise ent-

standene Luftblasen wurden entfernt. Nach dem Abkühlen wurde das Gel vorsichtig in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) gelegt. Jeweils 10 μ l der DNA-Probe aus der PCR (Absatz 2.1.3.3) wurden mit 1 μ l 10x-Ladepuffer [Life Technologies, Carlsbad, CA, USA (jetzt Thermo Fisher Scientific)] vermischt und in die Kammern des Agarosegels gefüllt. Als Referenz diente 100 bp DNA Ladder (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) und es wurde jeweils eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle ergänzt. Dann wurde für 45 Minuten eine Spannung von 120 V angelegt. Schließlich wurde das Gel in einem Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm analysiert, um das Transgen mit einer erwarteten Größe von 248 Basenpaaren (bp) nachzuweisen.

2.2 NT4X-Antikörper

NT4X ist ein muriner monoklonaler IgG2b-Antikörper, der selektiv gegen N-terminal trunkierte oder modifizierte A β -Varianten gerichtet ist und die Toxizität von A β_{4-42} auf Nervenzellen *in vitro* unterbindet (Absatz 1.7.2.3). Dabei bindet NT4X bevorzugt an lösliche A β -Oligomere und nur schwach an Plaque-gebundenes A β (Antonios et al. 2013). Daher erschien das transgene Tg4-42-Mausmodell, bei dem die A β_{4-42} -Variante selektiv exprimiert wird und bei dem es nicht zur Ablagerung von A β in extrazellulären Plaques kommt (Bouter et al. 2013), als geeignet für die Überprüfung der protektiven Eigenschaften von passiver Immunisierung mit NT4X auf die Toxizität von A β_{4-42} *in vivo*. Die in dieser Arbeit verwendeten NT4X-Antikörper wurden aus einer Zellkultur der NT4X-Hybridomzelllinie entsprechend der von Antonios et al. (2015) beschriebenen Methoden hergestellt.

2.2.1 Charakterisierung des NT4X-Antikörpers mit synthetischen Peptiden

Für die Charakterisierung des für die passive Immunisierung verwendeten NT4X-Antikörpers wurde ein Western Blot mit synthetischen Peptiden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Es wurde getestet, ob der Antikörper an die synthetischen Peptide A β_{4-38} , A β_{4-40} , A β_{4-42} , A β_{pE3-40} , A β_{pE3-43} , A β_{1-40} , A β_{1-42} und A β_{5-42} (Peptide Specialty Laboratory GmbH, Heidelberg, Deutschland) bindet. Zunächst wurden die Peptide in einer Konzentration von 1 mg/ml in 10 mM NaOH gelöst und im Mikrowellenbad Sonorex RK100H (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) monomerisiert, bevor sie mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei einer Temperatur von -80 °C gelagert wurden. Nach dem Auftauen wurden die Peptide für 5 Minuten erneut im Mikrowellenbad monomerisiert. Danach wurde jeweils 1 μ l Peptid mit 1 μ l 2x VarioGel SDS Probenpuffer (anamed Elektrophorese, Groß-Bieberau, Deutschland) in einem 0,5-ml-Reagiergefäß, PP (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vermischt und für 10 Minuten auf einem UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) bei 95 °C inkubiert. Daraufhin wurde jeweils 1,5 μ l des Gemisches sowie je 5 μ l der Protein-Standards Spectra Multicolor Low und Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scien-

tific, Waltham, MA, USA) in die Taschen eines 1.0 mm VarioGels 4-12% mit 12 Bahnen (anamed Elektrophorese, Groß-Bieberau, Deutschland) gegeben. Diese wurde in eine XCell SureLock mini cell Blotkammer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, jetzt Thermo Fisher Scientific) gestellt, die mit 500 ml Laufpuffer (1x Vario Gel Tricine SDS running buffer, anamed Elektrophorese, Groß-Bieberau, Deutschland) gefüllt war. Anschließend wurde an die Blotkammer eine Spannung von 60 V für 45 Minuten und dann 150 V für etwa 60 Minuten angelegt. Sobald der Standard am Ende des Gels angelangt war, wurde die Blotkammer geöffnet und das Gel in 1x Vario Gel Transferpuffer (anamed Elektrophorese, Groß-Bieberau, Deutschland) mit 20% Methanol gelegt. Danach wurde das Gel mit einer 0.45 μm Amersham Hybond ECL Trägermembran (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Großbritannien) bedeckt und zwischen zwei Filterpapieren in die Transferbox (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) gelegt. Dort wurde über 45 Minuten eine Spannung von 25 V angelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Trägermembran zwei Mal für 10 Minuten in 1x TBS-T [0,05% Tween (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,01 M TBS [Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland]] geschwenkt und für 5 Minuten in einer Mikrowelle erhitzt, um eine Signalverstärkung zu erreichen. Dabei wurde zum Aufkochen eine Wattzahl von 800 W verwendet und dann auf 80 W verringert. Schließlich wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 10% Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in TBS-Triton geblockt und dann über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenkschüttler (GFL, Burgwedel, Deutschland) mit NT4X als primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Membran erneut zwei Mal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und dann für 1,5 Stunden mit dem secondary goat-anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) als sekundärer Antikörper in einer Verdünnung von 1:4000 bei Raumtemperatur auf einem Duomax 1030 Plattformschüttler (Heidolph, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Nach dem erneuten zweimaligen Waschen mit TBS-T für 10 Minuten wurde die Membran mit der Entwicklerlösung (Luminata Crescendo Western HRP, Merck, Darmstadt, Deutschland) benetzt und mit dem Odyssey Fc Dual-Mode Imaging System (LI-COR, NE, USA) entwickelt. Zur Auswertung diente die Software Image Studio Version 3.1 (LI-COR, NE, USA).

2.2.2 Intraperitoneale Injektion

Mithilfe von passiver Immunisierung sollte das therapeutische Potenzial von NT4X analysiert werden. Dafür erhielten Tg4-42_{hom}-Mäuse über einen Zeitraum von 12 Wochen einmal wöchentlich eine intraperitoneale Injektion mit NT4X oder mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung). Für die Injektionen wurden die Einmal-Feindosierungsspritzen Omnican F 1 ml (B. Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet. Vor jeder Injektion wurden die Mäuse gewogen, bevor gewichtsadaptiert eine jeweils mit 10 μl pro 1 g berechnete Dosis appliziert wurde.

Der NT4X-Antikörper zur Injektion wurde gelöst in sterilem PBS (pH 7,4) in einer Konzentration von 1 µg pro µl verwendet.

Bei jeder Substanzapplikation wurde darauf geachtet, den dabei entstehenden Stress für die Tiere sowie mögliche Schmerzen zu minimieren. Alle Injektionslösungen wurden vor der Applikation mit der Hand angewärmt.

2.3 Verhaltenstests

Um das Gedächtnis, das Verhalten und die motorischen Fähigkeiten der Tg4-42_{hom}-Mäuse zu untersuchen, wurden die Tiere verschiedenen Tests unterzogen. Mithilfe von Morris Water Maze und Cross Maze sollten mögliche Defizite im Gedächtnis und im Verhalten der Mäuse aufgedeckt werden, während der String Suspension-, der Balance Beam- und der Claspings-Test die Einschätzung der motorischen Fähigkeiten ermöglichen sollten. Alle Tests wurden zwischen 8 und 20 Uhr durchgeführt, also in der dunklen Phase des umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus. Dabei mussten die Mäuse höchstens einen Motor- und einen Gedächtnistest pro Tag absolvieren. Die unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 5 bis 7 Monaten wurden in Zusammenarbeit mit Andreas Brauß getestet.

2.3.1 String Suspension-Test

Mit dem String Suspension-Test wurde die Motorik der Mäuse mit besonderem Augenmerk auf Greifkraft und Koordination getestet (Miquel und Blasco 1978; King et al. 1999). Dafür wurde eine 51 cm lange Schnur mit einem Durchmesser von etwa 2 mm in 30 cm Höhe zwischen zwei Stäben aus Holz aufgespannt (Abbildung 4). Die Fläche darunter war gepolstert, um Verletzungen zu vermeiden. Außerdem fand der Test unter Rotlicht statt. Die Mäuse wurden dazu gebracht, mit den Vorderpfoten die Schnur zu ergreifen. Sobald die Mäuse sicher an der Schnur hingen, wurden sie losgelassen. Dann hatten sie 60 Sekunden Zeit, um zu einem der hölzernen Stäbe zu gelangen (King et al. 1999). Wenn sie herunterfielen wurde der Test abgebrochen und die Maus mit 0 Punkten bewertet. Ansonsten wurde nach 60 Sekunden eine Punktzahl zwischen 1 und 5 vergeben (Tabelle 2), wobei die Position der Maus nur zu diesem Zeitpunkt in die Bewertung einbezogen wurde. Jede Maus absolvierte einen Durchgang. Der Testapparat wurde jedes Mal mit 70% Ethanol (Walter-CMP, Kiel, Deutschland) gereinigt, um Geruchsspuren zu entfernen.

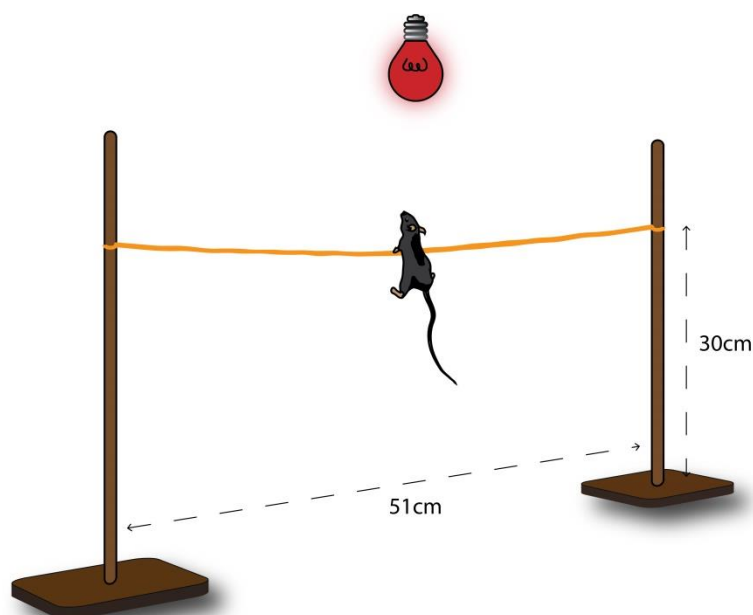


Abbildung 4: Versuchsaufbau für den String Suspension-Test.

Tabelle 2: Punkteschlüssel beim String Suspension-Test (Moran et al. 1995).

Punktzahl	Erklärung
0	Maus fällt herunter
1	Maus hängt nur an ihren Vorder- oder Hinterpfoten
2	Maus hängt an Vorder- oder Hinterpfoten und versucht, hinaufzuklettern
3	Maus hängt mit mind. drei Pfoten an der Schnur, keine laterale Bewegung
4	Maus hält die Schnur mit allen vier Pfoten + Schwanz und zeigt laterale Bewegung
5	Maus erreicht eines der beiden Enden der Schnur

2.3.2 Balance Beam-Test

Der Balance Beam-Test wurde durchgeführt, um die motorischen Fähigkeiten der Mäuse zu bewerten. Dabei wurde vor allem auf die Koordination der Mäuse, insbesondere die Feinmotorik und die Balance geachtet (King et al. 1999; Luong et al. 2011).

Beim Balance Beam handelte es sich um einen in 45 cm Höhe angebrachten und 51 cm langen hölzernen Stab mit einem Durchmesser von 1 cm, der an beiden Enden in eine Plattform mit den Abmessungen 9 cm Breite x 15 cm Länge überging (Abbildung 5). Die Fläche darunter wurde gepolstert, um Verletzungen zu vermeiden. Außerdem fand der Test unter Rotlicht statt.

Zunächst wurde jede Maus einmal mit dem Gesicht zu einer der Plattformen auf die Mitte des Stabes gesetzt und vorsichtig zu einer dieser Plattformen geführt, um sie an die Testanlage zu gewöhnen (Luong et al. 2011). Nach diesem Training begann die eigentliche Testphase. Die Mäuse wurden wieder in der Mitte des Stabes platziert und losgelassen, sobald sie sicher saßen. Innerhalb von 60 Sekunden sollten die Mäuse nun selbstständig zu einer

der beiden Plattformen laufen. Gemessen wurde die Zeit, in der sich die Mäuse auf dem Stab hielten, bis sie herunterfielen. Erreichten sie eine der Plattformen in der vorgegebenen Zeit oder hielten sie sich über die gesamte Zeitdauer auf dem Stab, wurde der Durchlauf mit 60 Sekunden vermerkt (King et al. 1999). Nach insgesamt drei Durchgängen, zwischen denen die Mäuse eine Ruhepause von 10 Minuten erhielten, wurde für jede Maus der Mittelwert dieser drei Läufe gebildet und ausgewertet.

Während des gesamten Tests wurden der Stab und die Plattformen nach jedem Lauf mit 70% Ethanol (Walter-CMP, Kiel, Deutschland) gereinigt, um den Einfluss von Geruchsspuren zu vermeiden.

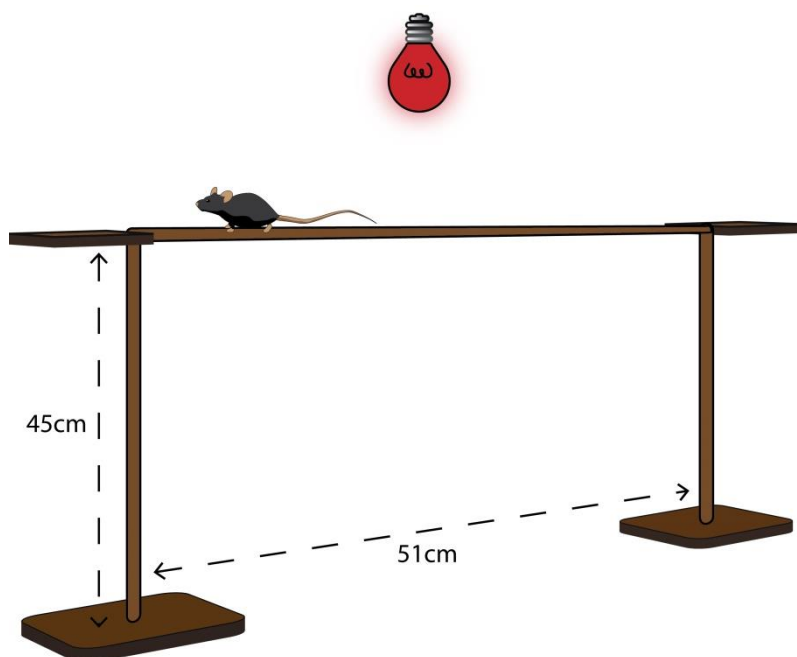


Abbildung 5: Versuchsaufbau für den Balance Beam-Test.

2.3.3 Claspings

Für die Bewertung der Motorik wurde das Claspings-Verhalten beurteilt, das Aufschlüsse über motorische Defizite bei verschiedenen Mausmodellen für neurodegenerative Erkrankungen liefern kann (Guyenet et al. 2010).

Um das Claspings-Verhalten zu testen, wurden die Mäuse an der Schwanzbasis aus dem Käfig gehoben und für 10 Sekunden kopfüber hängen gelassen. Dabei wurde beobachtet, ob die Maus ihre Pfoten an den Körper klammert oder, wie es bei gesunden Mäusen der Fall sein sollte, alle vier Extremitäten von sich streckt, strampelt oder den Körper verbiegt. Die Mäuse wurden mit einer Punktzahl von 0 bis 3 bewertet [Tabelle 3 (Miller et al. 2008)].

Tabelle 3: Punkteschlüssel für das Claspings-Verhalten (Miller et al. 2008).

Punktzahl	Erklärung
0	Kein Klammern
1	Klammern mit den Vorderpfoten
2	Klammern mit den Vorderpfoten und einer Hinterpfote
3	Klammern mit Vorder- und Hinterpfoten

2.3.4 Morris Water Maze

Mithilfe des Morris Water Maze wurden das räumliche Bezugsgedächtnis und das Lernverhalten der Mäuse untersucht (Morris 1981; Morris 1984). Der Versuchsaufbau war angelehnt an die von Vorhees und Williams (2006) präsentierten Versuchsprotokolle.

Die Mäuse sollten lernen, in einem Wasserbecken mit dem Durchmesser von 110 cm unter Zuhilfenahme visueller räumlicher Hinweise eine unter der Wasseroberfläche verborgene runde Plattform mit einem Durchmesser von 10 cm zu lokalisieren und zu besteigen. Bei dem Wasser handelte es sich um gewöhnliches Leitungswasser, das mit gesundheitlich unbedenklicher weißer Farbe undurchsichtig gemacht und konstant bei einer Temperatur um 20 °C gehalten wurde. Das Becken wurde in vier Quadranten unterteilt, die nach dem jeweiligen Verhältnis zur Plattform als Zielquadrant, linker, rechter und gegenüberliegender Quadrant bezeichnet wurden. Die Mäuse wurden an verschiedenen Startpunkten am Rand des Beckens mit dem Gesicht zur Beckenwand ins Wasser gesetzt. Die Bewegungen der Mäuse im Becken wurden von einer Kamera (Computar 2,8-12 mm, Commack, NY, USA) aufgezeichnet und mit dem AnyMaze video tracking System (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) ausgewertet. Die Zeit zwischen den Durchgängen betrug etwa 10 bis 15 Minuten. Während dieser Zeit wurden die Mäuse mit einer Wärmelampe angestrahlt, um eine Auskühlung zu vermeiden.

Der Test begann mit dem dreitägigen *Cued Training*, bei dem die Plattform mit einer dreieckigen Fahne markiert wurde (Abbildung 6a). Die Mäuse erhielten 60 Sekunden Zeit, um die Plattform zu finden und zu besteigen. Schafften sie dies innerhalb der vorgegebenen Zeitspanne nicht, wurden sie dorthin geleitet. Jede Maus durfte etwa 10 Sekunden auf der Plattform verweilen, bevor sie wieder in den Käfig gesetzt wurde. Nach jedem der vier Durchgänge pro Tag wurde sowohl die Position der Plattform als auch der Startpunkt geändert (Tabelle 4).

Im Anschluss an den dritten Tag des *Cued Trainings* erhielten die Mäuse einen Tag Pause und begannen dann das fünftägige *Acquisition Training*, um das räumliche Lernen zu testen. Hierfür wurde die Fahne auf der Plattform entfernt und stattdessen zusätzlich zu den bereits im Raum vorhandenen distalen Hinweisen proximale Hinweise am Beckenrand angebracht. Dabei handelte es sich um Fahnen, die sich in Form und Farbe deutlich unterschieden und während der restlichen Testtage an derselben Position blieben (Abbildung 6b). Die Lokalisation der Plattform blieb über die gesamten 5 Tage konstant, während der Start-

punkt der Mäuse nach jedem Durchgang variierte (Tabelle 4). Ansonsten wurden die Mäuse genauso behandelt wie im *Cued Training*.

Am folgenden Tag schloss sich der *Probe Trial* an, der Auskunft über das räumliche Bezugsgedächtnis liefern sollte. Hierfür wurde die Plattform entfernt und die Mäuse schwammen für die Dauer einer Minute, während ihr Weg aufgezeichnet und die Zeit in jedem der vier Quadranten ermittelt wurde (Abbildung 6c). Der Startpunkt war dabei dem Zielquadranten gegenübergestellt. Bei intaktem räumlichem Bezugsgedächtnis sollten die Mäuse eine klare Präferenz für den Zielquadranten zeigen.

Die Daten der Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 4 Monaten wurden von Yvonne Bouter erhoben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

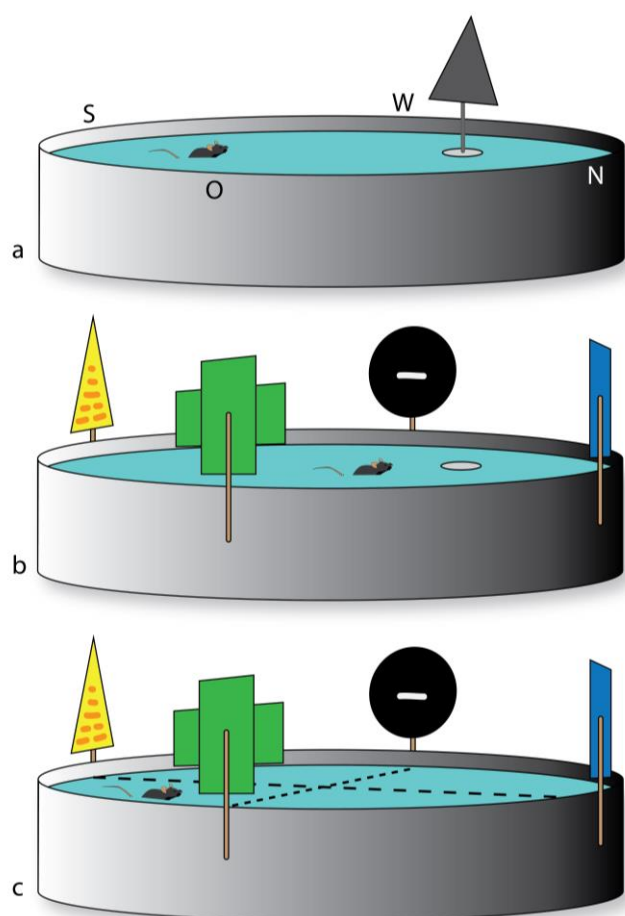


Abbildung 6: Versuchsaufbau des Morris Water Maze.

a Während des *Cued Trainings* an den ersten drei Testtagen wurde die Plattform mit einer Markierung versehen. **b** Für das fünftägige *Acquisition Training* wurde diese Markierung entfernt und stattdessen proximale Hinweise angebracht, mit deren Hilfe die Mäuse zu der versteckten Plattform finden sollten. **c** Am Tag des *Probe Trials* wurde die Plattform entfernt und gemessen, wie viel Zeit sich die Mäuse in den vier Quadranten des Beckens aufhielten, um das räumliche Bezugsgedächtnis zu testen.

Tabelle 4: Start- und Zielpositionen für das Morris Water Maze.

<i>Cued Training</i>	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3		Durchgang 4	
	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel
1	N	SO	O	NO	S	SW	W	SO
2	S	NO	N	NW	W	NO	O	SO
3	W	NW	S	SO	O	SW	N	SW

<i>Acquisition Training</i>	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3		Durchgang 4	
	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel	Start	Ziel
1	N	SW	O	SW	SO	SW	NW	SW
2	SO	SW	N	SW	NW	SW	O	SW
3	NO	SW	SO	SW	O	SW	N	SW
4	O	SW	NW	SW	N	SW	SO	SW
5	N	SW	SO	SW	O	SW	NW	SW

<i>Probe Trial</i>	Durchgang 1	
Test Tag	Start	Ziel
1	NO	entfernt

(N = Norden, O = Osten, S = Süden, W = Westen, NO = Nordosten, SO = Südosten, NW = Nordwesten, SW = Südwesten)

2.3.5 Cross Maze

Das Cross Maze wurde durchgeführt, um das Arbeitsgedächtnis der Mäuse zu untersuchen. Dafür wurden die Mäuse mit dem Gesicht zur Wand zufällig in einen der vier exakt gleichen Arme eines kreuzförmigen Labyrinths gesetzt und deren Laufwege mithilfe des AnyMaze video tracking Systems (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) und der daran angeschlossenen Kamera (Computar 2,8-12 mm, Commack, NY, USA) verfolgt. Die Arme hatten die Maße 30 cm Länge x 8 cm Breite x 15 cm Höhe und bestanden aus dunklem Plastik (Abbildung 7). Jede Maus durfte über einen Zeitraum von 10 Minuten das Labyrinth frei erkunden. Dabei wurde das Betreten eines Arms nur als solches gewertet, wenn sich alle vier Pfoten im Arm befanden. Außerdem wurde der direkte Wiedereintritt in einen Arm als ein einziger Armeintritt gewertet. Nach jedem Lauf wurde das Labyrinth mit 70% Ethanol (Walter-CMP, Kiel, Deutschland) in Aqua bidest. gereinigt, um mögliche Geruchsspuren zu entfernen. Außerdem hatten die Mäuse keinerlei visuelle Hinweise und der Test wurde unter Rotlicht durchgeführt.

Das Cross Maze stützt sich auf die Tendenz von gesunden Mäusen mit intaktem Arbeitsgedächtnis, neue Arme zu erkunden, anstatt kurz zuvor bereits betretene Arme wieder aufzusuchen (Wietrzyk et al. 2005). Als Armwechsel wurde dabei das aufeinanderfolgende Betreten aller vier Arme als überlappende Vierfach-Sets (also beispielsweise 1, 2, 3, 4 oder

3, 4, 2, 1) definiert. Die so erhobene Anzahl der Armwechsel wurde als prozentualer Anteil von der insgesamt möglichen Anzahl an Armwechseln ($\text{Armeintritte}_{\text{gesamt}} - 3$) ermittelt (Wietrzych et al. 2005). Deutlich reduzierte Werte dieser Armwechselrate im Cross Maze weisen auf ein gestörtes Arbeitsgedächtnis hin.

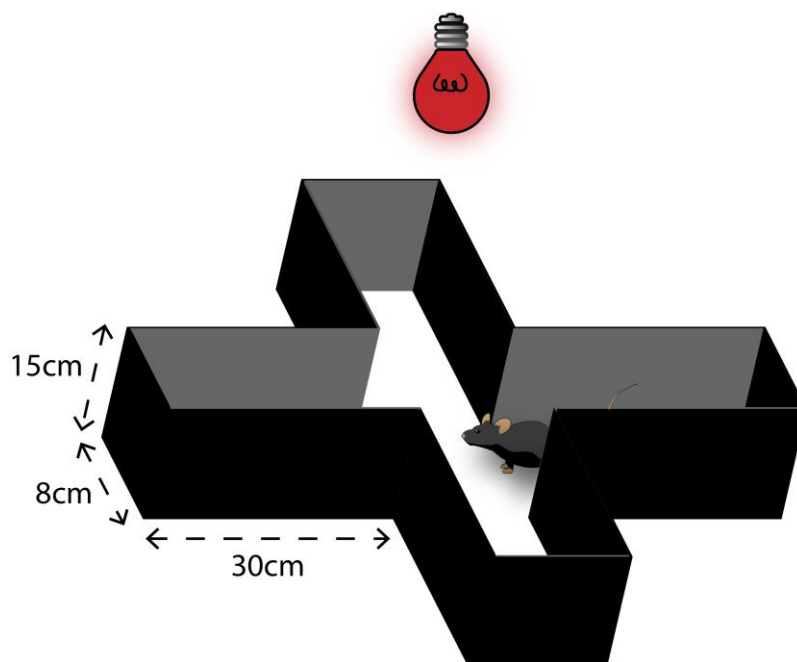


Abbildung 7: Versuchsaufbau für das Cross Maze.

2.4 Gewinnung und Präparation von Hirngewebe

2.4.1 Genickbruch

Nach einer CO_2 -Anästhesie wurden die Mäuse von hierfür ausgebildeten Mitarbeitern mit der entsprechenden Genehmigung mittels zervikaler Dislokation getötet. Daraufhin wurde der Kadaver auf Eis gelegt und mit einer Schere dekapitiert. Die Haut sowie subkutanes Gewebe wurden entlang der dorsalen Mittellinie des Schädels zerteilt und vom Schädelknochen gelöst. Dann wurde die Schädelkalotte mit einer feinen chirurgischen Schere in sagittaler Schnittrichtung entlang der Pfeilnaht (*Sutura sagittalis*) sowie links und rechts entlang des Schläfenbeins (*Os temporale*) eröffnet und mit einer Pinzette abgehoben. Mithilfe eines Spatels wurde das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel gelöst und mit einem Skalpell zwischen den Hemisphären in zwei Hälften zerteilt. Die beiden Hemisphären wurden mit einem chirurgischen Spatel auseinandergeschoben und je nach Verwendungszweck wurde das Kleinhirn (*Cerebellum*) abgetrennt. Schließlich wurde das Gewebe entweder direkt auf Trockeneis eingefroren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert oder in eine Rotilabo-Einbettkassette aus Polyoxymethylen (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) platziert, die dann für mindestens 72 Stunden in einer 4%igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung (Roti-Histofix; Carl

Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelagert wurde, um das enthaltene Gewebe später in Paraffin zu fixieren.

2.4.2 Perfusion

Um eine optimale Fixierung des Hirngewebes sicherzustellen, wurde das Gefäßsystem der Mäuse von Mitarbeitern mit entsprechender Ausbildung und Genehmigung mit 4%iger Paraformaldehydlösung perfundiert.

Zur Herstellung dieser Lösung wurde 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,01 M Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; Biochrom, Berlin, Deutschland) gelöst und für eine Stunde unter ständigem Rühren auf 70 °C erhitzt. Daraufhin wurde die Lösung mit 5 M NaOH geklärt, gefiltert und auf 4 °C gekühlt.

Für die Perfusion erhielten die Mäuse zunächst 200-300 µl eines Anästhetikums [10% Xylazin (Xylarium, Ecuphar NV/SA, Oostkamp, Belgien), 20% Ketamin (Ketamin 10%, Medistar GmbH, Ascheberg, Deutschland), 70% H₂O], das intraperitoneal mithilfe einer Einmal-Feindosierungsspritze Omnican F 1 ml (B. Braun, Melsungen, Deutschland) appliziert wurde. Die Injektionstechnik war dabei die gleiche wie im Absatz 2.2.2 beschrieben. Die Perfusionspumpe Ismatec ISM861 (Idex, Lake Forest, IL, USA) wurde mit einer 100 Sterican 0,90 x 70 mm Kanüle (B. Braun, Melsungen, Deutschland) versehen und der Schlauch mit PBS durchspült, bis keine Luft mehr darin enthalten war. Außerdem wurden die 4%ige Paraformaldehydlösung und PBS in gleicher Menge auf 4 °C gekühlt und auf Eis gelagert.

Nachdem die Anästhesie ihre volle Wirkung entfaltet hatte und jegliche Reaktionen auf Schmerzreize erloschen waren, wurde die Maus mit Nadeln an allen vier Extremitäten auf einer Perfusionsplatte aus Styropor fixiert. Daraufhin wurde die Haut über Thorax und Abdomen unter Verwendung einer chirurgischen Schere mit einem Medianschnitt inzidiert und das Operationsgebiet mit zwei weiteren Schnitten nach lateral freigelegt. Dann wurde das Abdomen eröffnet, um von dort über das Zwerchfell Zugang zum Thorax zu erlangen. Dieser wurde mithilfe einer feinen chirurgischen Schere entlang des Sternums sowie zweier dazu paralleler lateraler Schnitte zerteilt und dann mit einer Pinzette aufgeklappt. Das schlagende Herz wurde mit einer Pinzette locker fixiert, bevor die Punktion der linken Herzkammer mit der Kanüle der Perfusionspumpe erfolgte. Die rechte Herzkammer wurde mithilfe der feinen chirurgischen Schere mit einem kleinen Einschnitt versehen, um den Ablauf der Perfusionsflüssigkeit zu ermöglichen. Daraufhin wurde die Maus mit etwa 40 ml PBS und danach mit derselben Menge 4%iger Paraformaldehydlösung perfundiert. Als Indikator für eine erfolgreiche Perfusion diente zunächst die Entfärbung der Leber infolge der Verdrängung des Blutes im Gefäßsystem durch PBS und später, unter dem Einfluss von Formalin, die zunehmende Versteifung der Maus.

Das Gehirn wurde wie im Absatz 2.4.1 beschrieben präpariert. Die jeweils rechte Hemisphäre wurde bei -80 °C tiefgefroren, während die linke Hemisphäre über Nacht bei 4 °C in PFA gelagert und danach für zwei Tage in eine Lösung mit 30% D(+)-Saccharose (Carl

Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,01 M PBS bei 4 °C überführt wurde. Nachdem die Gehirnhälfte in der Saccharoselösung an den Grund des Behälters gesunken war, wurde sie auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5 Quantifizierung der Neuronenzahl

Die Bestimmung der Anzahl an Nervenzellen in der CA1-Region des Hippocampus erfolgte mithilfe der Design-basierten Stereologie, die im Gegensatz zur Modell-basierten Stereologie unabhängig ist von Größe, Form, räumlicher Orientierung und räumlicher Verteilung des zu untersuchenden dreidimensionalen Objektes (West 2002). Dafür wurden perfundierte und fixierte Großhirnhemisphären zunächst am Kryotom geschnitten, dann mit Kresylviolett gefärbt und schließlich am Mikroskop mithilfe eines daran angeschlossenen Computers ausgezählt.

2.5.1 Schneiden am Kryotom

Am Kryotom CM 1850 UV (Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden die bei -80 °C gelagerten perfundierten linken Großhirnhemisphären der Mäuse (Absatz 2.4.2) in Schnitte von 30 µm Dicke zerteilt. Dafür wurden die Gehirnhälften aufrecht mit einem Tissue-Tek O.C.T. Compound Kleber (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) fixiert und ummantelt. Daraufhin wurde die gesamte Hemisphäre in der koronalen Ebene geschnitten und jeder Zehnte Schnitt in einem Gläschen gesammelt. Als Klingen wurden Microtome Blades C35 (Feather, Osaka, Japan) verwendet. Schließlich wurden die Schnitte nach Sammelgläschen geordnet auf Objektträger gezogen.

2.5.2 Kresylviolett-Färbung

Die am Kryotom angefertigten Hirnschnitte wurden mit Kresylviolett gefärbt, um die Nervenzellen für die stereologische Analyse sichtbar zu machen.

Für die Delipidierung der Schnitte und für deren Färbung wurden folgende Lösungen verwendet:

Arbeitslösung A: 16,61 g Natriumacetat-Trihydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde in 100 ml Aqua bidest. gelöst. Von dieser Lösung wurden 40 ml mit 9,6 ml 100%iger Essigsäure (Merck Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland) vermischt und mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.

Arbeitslösung B: 2 ml Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden in 98 ml Aqua bidest. gegeben und für eine Stunde verrührt. Davon wurden dann 2,5 ml mit 50 ml Aqua bidest. und 150 ml 100%igem Ethanol (Walter-CMP, Kiel, Deutschland) vermischt.

Färbelösung: 0,1 g cresyl violet acetate (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurde in einem Liter der Arbeitslösung A für 30 Minuten verrührt, über Nacht stehen gelassen und

vor dem Gebrauch gefiltert. Außerdem wurde die Färbelösung vor direktem Licht geschützt.

Die Schnitte wurden nach folgendem Prinzip behandelt: 2 x 10 Minuten in der Arbeitslösung A, gefolgt von 1 x 20 Minuten in der Arbeitslösung B und erneut 2 x 10 Minuten in der Arbeitslösung A. Nachdem die Gewebeproben so entfettet worden waren, wurden sie für 2 x 8 Minuten mit der Färbelösung gefärbt.

Daraufhin wurden die Proben 3 x 1 Minute mit der Arbeitslösung A gewaschen und mit einer Alkoholreihe aus 3 Minuten 100% Ethanol, 10 Minuten 2-Propanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 2 x 5 Minuten Xylol (Isomere) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) dehydriert.

Die so präparierten Schnitte wurden auf ihrem Objektträger mit einigen Tropfen des synthetischen Einschlussmittels Roti-Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) benetzt und mit einem Deckgläschen (Menzel-Gläser 24 x 60 mm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bedeckt. Nachdem die Proben ausgehärtet waren, konnten sie für die Stereologie verwendet werden.

2.5.3 Stereologie

Mittels Stereologie wurde die Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus der Tg4-42_{hom}-Mäuse bestimmt. Dafür wurden die Nervenzellen aller mit Kresylviolett gefärbten Schnitte eines Gläschens (Absatz 2.5.2) mithilfe eines BX51-Mikroskops mit motorisiertem Objektisch (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japan) und der Software Stereo Investigator (MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA) ausgezählt. Hierbei wurde zur Umrandung der CA1-Region eine 4fache Vergrößerung gewählt und für die Auszählung der Zellen eine 100 x Öl-Immersionslinse verwendet. Die Zellen wurden in einem Gitternetz mit einer Maschenweite von 49 x 105 µm in zufällig ausgewählten quadratischen Zählrahmen von 14 x 14 µm Kantenlänge nach den Grundprinzipien der Designbasierten Stereologie und nach vorher festgelegten Zählregeln gezählt (West 2002; Schmitz und Hof 2005), (Abbildung 8). Für jeden neuen Zählrahmen wurde die Schnittdicke neu gemessen mit einer *optical dissector height* von 5µm. Als *top guard zone* wurde eine Dicke von 2 µm festgelegt. In die Auswertung wurden Schnitte aus der CA1-Region zwischen Bregma -1,22 mm und -3,52 mm einbezogen (Paxinos und Franklin 2013). Mithilfe der *optical dissector*-Zählmethode und der *optical fractionator*-Methode (West et al. 1991) wurden die Zählrahmen zufällig ausgewählt und die Gesamtzahl der Nervenzellen in der CA1-Region mit den Formeln A,B und C (Tabelle 5 und Tabelle 6) näherungsweise berechnet.

Alle Schnitte wurden vor der Verwendung in der Stereologie für den Untersucher verblindet, um Bias-bedingte Abweichungen zu vermeiden

Die Daten der Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 3 und 8 Monaten, der drei- bzw. achtmonatigen Wildtypiere (Bouter et al. 2013) sowie die Daten zu viermonatigen Tg4-42_{hom}-Mäusen wurden von Yvonne Bouter zur Verfügung gestellt.

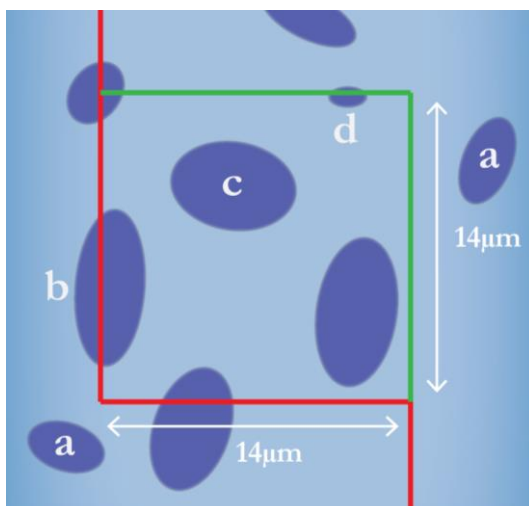


Abbildung 8: Zählrahmen und -regeln für die Design-basierte Stereologie.

Gezählt wurden ausschließlich Neurone mit scharfen Zellkernen (Nuclei). Zellen, die außerhalb des Zählrahmens lagen und solche, die eine der roten Linien berührten, wurden nicht gezählt (**a,b**). Gezählt wurden Zellen innerhalb des Zählrahmens oder mit Kontakt zu einer der grünen Linien (**c,d**). Die Position des Zählrahmens wurde von der Software zufällig ausgewählt.

Tabelle 5: Formeln zur Berechnung der Gesamtneuronenzahl in der CA1-Region

Formel	Erklärung	Berechnung
A	Berechnung des Zwischenwertes P	$P = asf \times ssf \times tsf$
B	Berechnung der Neuronenzahl eines einzelnen Schnittes $N_{Schnitt}$	$N_{Schnitt} = P \times tmc$
C	Berechnung der Gesamtneuronenzahl N_{gesamt}	$N_{gesamt} = \sum_{k=1}^n N_{Schnitt} k$

Tabelle 6: Erklärungen der Abkürzungen aus Tabelle 5

Abkürzung	Erklärung	Berechnung
asf	area sampling fraction: $\frac{\text{Fläche Gitternetzmasche } [\mu\text{m}^2]}{\text{Fläche Zählrahmen } [\mu\text{m}^2]}$	$\frac{49 \mu\text{m} \times 105 \mu\text{m}}{14 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}} = 26,25$
ssf	section sampling fraction: (jeder wievielte Schnitt wird gezählt)	10 (Absatz 2.5.1)
tsf	thickness sampling fraction: $\frac{\text{jeweilige Schichtdicke } [\mu\text{m}]}{\text{optical dissector height}}$	$\frac{\text{Schichtdicke } [\mu\text{m}]}{5 \mu\text{m}}$
tmc	total markers counted (Neuronenzahl)	In Stereo Investigator ermittelt

2.6 Statistik

Alle Daten wurden mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und Statistica Version 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) ausgewertet. Neben einfacher und zweifacher Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur wurden für den Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen Zweistichproben-t-Tests für gepaarte und ungepaarte Stichproben durchgeführt.

Die Signifikanzniveaus betragen bei allen statistischen Analysen $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$. Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, Standard Error of the Mean). Die Anzahl der verwendeten Tierzahlen (n) ist unter den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Genauere Informationen zu den einzelnen Analysen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

2.7 Software

Die für diese Arbeit verwendeten Programme sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Software

Programm	Hersteller
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Statistica Version 10	StatSoft, Tulsa, OK, USA
Image Studio Version 3.1	LI-COR, NE, USA
Adobe Illustrator Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Adobe Photoshop Elements 11	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Stereo Investigator	MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA

Alle gezeigten Abbildungen wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, unter Zuhilfenahme der genannten Software eigens für diese Arbeit angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des Transgens bei Tg4-42_{hom}-Mäusen

Alle für diese Arbeit verwendeten Mäuse stammten aus einer homozygoten Verpaarung der Tg4-42-Mauslinie. Dennoch wurden stichprobenartig bei etwa 30% der hier verwendeten Tg4-42-Mäuse die entsprechenden DNA-Sequenzen nachgewiesen, um das Vorhandensein des Transgens zu sichern. Dafür waren Banden im Bereich von 248 bp zu erwarten (Absatz 2.1.3.4).

In

Abbildung 9 sind exemplarisch die gelelektrophoretisch nachgewiesenen charakteristischen Banden dargestellt.

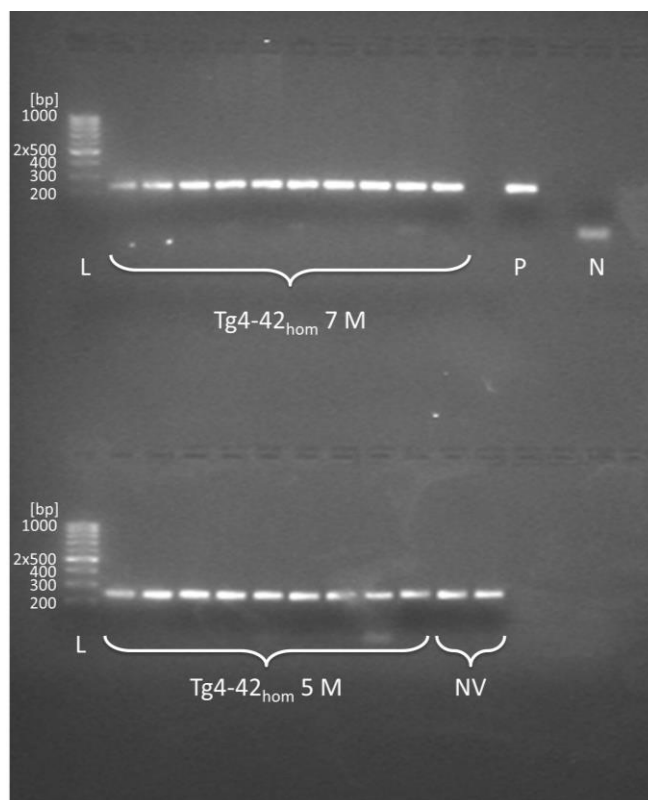


Abbildung 9: Gelelektrophoretischer Nachweis des Transgens bei Mäusen der Tg4-42-Linie.

Die deutlich sichtbaren Nukleinsäurebanden korrelieren gut mit der Positivkontrolle für Tg4-42_{hom}-Mäuse. L = DNA Ladder, P = Positivkontrolle, N = Negativkontrolle, M = Monate, NV = nicht verwendet.

3.2 Das Tg4-42_{hom}-Mausmodell im Altersverlauf

Für die Planung des Behandlungsschemas war es wichtig, Informationen über den Beginn sowie über den Zeitverlauf der Verhaltensdefizite und des Nervenzellverlusts bei homozygoten Tg4-42-Mäusen zu erhalten. Dafür wurden bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 4, 5, 6 und 7 Monaten verschiedene Verhaltenstests sowie mittels Stereologie eine Bestimmung der Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus durchgeführt, um auf der Grundlage dieser Daten ein Konzept für die Behandlung mit dem NT4X-Antikörper zu entwickeln (Abbildung 10).

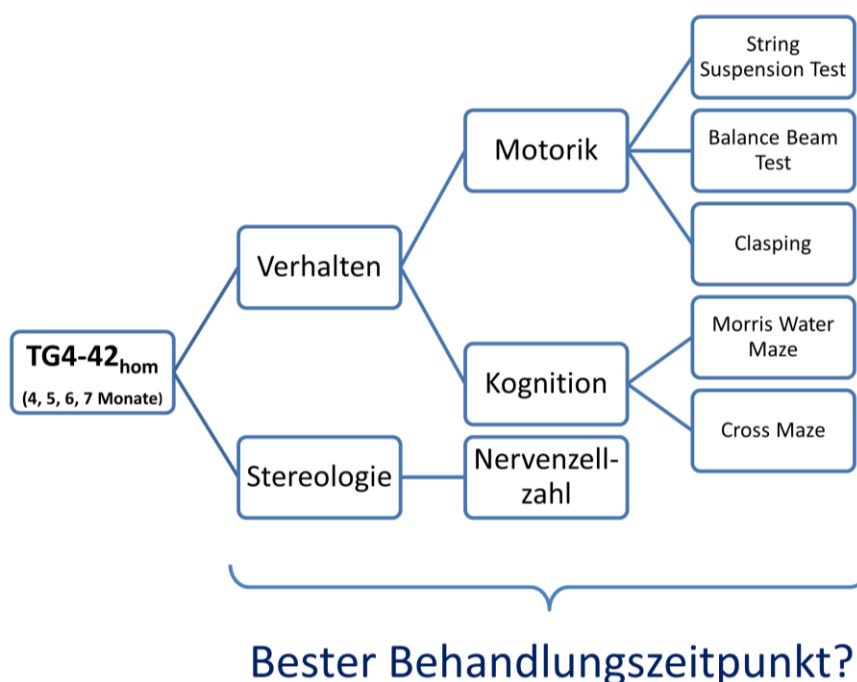


Abbildung 10: Übersicht der Experimente zur Ermittlung des optimalen Behandlungszeitpunktes.

3.2.1 Gewicht im Altersverlauf

Um zunächst einmal Hinweise darauf zu bekommen, ob sich die transgenen Tg4-42_{hom}-Mäuse im Altersverlauf körperlich regelrecht entwickelt hatten, wurden sie vor der Tötung gewogen. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Körpergewichts der Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 6 Monaten im Vergleich zu denen im Alter von 5 Monaten (Abbildung 11, einfache Varianzanalyse: $p < 0,05$). Die Mäuse im Alter von 7 Monaten übertrafen dieses Gewicht noch einmal deutlich im Vergleich zu ihren jüngeren Artgenossen (Abbildung 11, einfache Varianzanalyse, 5m: $p < 0,001$, 6m: $p < 0,01$). Diese Ergebnisse repräsentieren eine normale körperliche Entwicklung der Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 5 bis 7 Monaten.

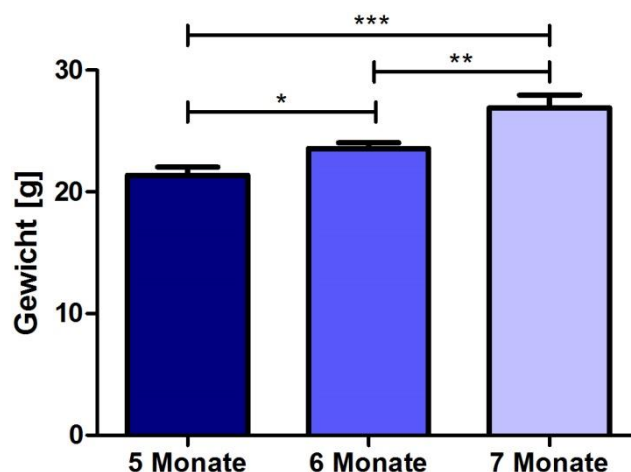


Abbildung 11: Körpergewicht zum Todeszeitpunkt bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5 bis 7 Monaten.

Die Gruppen der sechs- und siebenmonatigen Tg4-42_{hom}-Mäuse zeigten einen signifikanten Gewichtsunterschied im Vergleich zu den jeweils jüngeren Artgenossen, was auf einen kontinuierlichen Gewichtszuwachs und damit auf eine normale körperliche Entwicklung hinweist. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. $n = 9-17$ pro Gruppe (5m: $n = 16$; 6m: $n = 17$; 7m: $n = 9$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

3.2.2 Motorische Tests im Altersverlauf

Mit den motorischen Balance Beam- und String Suspension-Tests sowie dem Test auf Claspings-Verhalten wurde analysiert, ob bei Tg4-42_{hom}-Mäusen motorische Komponenten wie Feinmotorik, Koordination, Kraft und Balance beeinträchtigt sind.

Dafür absolvierten Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 5, 6 und 7 Monaten zunächst den Balance Beam-Test, um vor allem Koordination und Balance zu beurteilen. Hierbei wurde für insgesamt drei Durchgänge die durchschnittliche Zeit der Mäuse auf dem Stab gemessen. Die Mäuse der verschiedenen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede bei der Bewältigung des Tests. (Abbildung 12a, einfache Varianzanalyse).

Im String Suspension-Test wurden ebenfalls die Feinmotorik und die Koordination, besonders aber auch die Kraft analysiert. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5, 6 und 7 Monaten (Abbildung 12b, einfache Varianzanalyse).

Ein Claspings-Verhalten als weiterer Ausdruck gestörter Motorik war zu keinem Zeitpunkt erkennbar (Graph nicht gezeigt).

Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass die motorischen Fähigkeiten von Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5 bis 7 Monaten nicht beeinträchtigt sind.

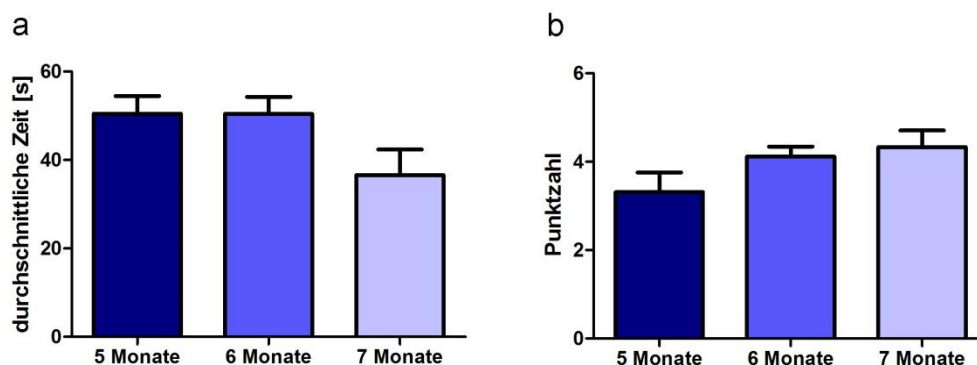


Abbildung 12: Unauffällige motorische Tests im Altersverlauf.

Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 5 bis 7 Monaten zeigten weder im Balance Beam-Test (a), noch im String Suspension-Test (b) signifikante Abweichungen ihrer motorischen Fähigkeiten wie Feinmotorik, Kraft, Balance oder Koordination. Die Ergebnisse deuten auf eine intakte Motorik bei den Tg4-42_{hom}-Mäusen dieses Alters hin. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. $n = 9-17$ pro Gruppe (5m: $n = 16$; 6m: $n = 17$; 7m: $n = 9$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

3.2.3 Morris Water Maze im Altersverlauf

Für die Ermittlung möglicher Beeinträchtigungen des räumlichen Bezugsgedächtnisses und des Lernverhaltens absolvierten die Mäuse das Morris Water Maze.

Der Test begann mit dem dreitägigen *Cued Training*, bei dem die Mäuse sich an das Becken gewöhnen und lernen sollten, eine markierte Plattform zu finden und zu besteigen. Alle Mäuse verbesserten im Verlauf dieser 3 Tage deutlich die Fluchtzeit, also die Zeit, die sie brauchten, um auf die Plattform zu gelangen (Abbildung 13a, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, 4m, 5m, 6m und 7m: Haupteffekt der Tage: $p < 0,0000001$).

Die Schwimgeschwindigkeiten waren vergleichbar (Abbildung 13b), dennoch war ein Gruppeneffekt zu erkennen (zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, 4m, 5m, 6m und 7m: Haupteffekt des Alters: $p = 0,000718$). Die Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 6 Monaten schwammen am ersten Tag signifikant langsamer als ihre siebenmonatigen Artgenossen (einfache Varianzanalyse, 7m: $p < 0,01$) und am dritten Tag langsamer als die vier-, fünf- und siebenmonatigen Tiere (einfache Varianzanalyse, 4m: $p < 0,001$; 5m: $p < 0,01$; 7m: $p < 0,01$), doch hatte dies keinen negativen Effekt auf die Fluchtzeiten. Aus den Daten des *Cued Trainings* lässt sich schließen, dass alle Mäuse sowohl über ein intaktes Sehorgan als auch über die für die Bewältigung des Morris Water Maze nötigen motorischen Fähigkeiten für das Schwimmen im Wasser verfügten.

Im Anschluss an das *Cued Training* wurde nach einem Tag Pause das *Acquisition Training* durchgeführt. Hierbei wurde getestet, ob die Mäuse in der Lage sind, mithilfe von proximalen und distalen Hinweisen eine unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform zu finden. Auch hier zeigten alle Altersgruppen einen deutlichen Lerneffekt mit signifikant verbesserten Fluchtzeiten innerhalb der 5 Tage (Abbildung 13c, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, 4m, 5m, 6m und 7m: Haupteffekt der Tage: $p < 0,0000001$). Dar-

über hinaus war ein Effekt zwischen den Gruppen untereinander ersichtlich (zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, 4m, 5m, 6m und 7m: Haupteffekt des Alters: $p = 0,000219$). Die Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 4 Monaten zeigten kürzere Zeiten im Vergleich zu solchen Mäusen im Alter von 6 Monaten an den Tagen 3 bis 5 (einfache Varianzanalyse, 6m: Tag 3: $p < 0,001$; Tag 4 und 5: $p < 0,01$) und ließen ebenfalls verbesserte Werte erkennen im Vergleich zu den fünf- und siebenmonatigen Mäusen an Tag 3 (einfache Varianzanalyse, 5m und 7m: $p < 0,05$).

Auch im *Acquisition Training* zeigte sich ein Gruppeneffekt (Abbildung 13d, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, 4m, 5m, 6m und 7m: Haupteffekt des Alters: $p < 0,001198$) im Sinne einer verminderten Schwimmgeschwindigkeit der Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 6 Monaten im Vergleich zu jenen im Alter von 4 Monaten (einfache Varianzanalyse, 4m: Tag 1 und 4: $p < 0,05$) und 5 Monaten (einfache Varianzanalyse, 5m: Tag 1,2,3 und 5: $p < 0,05$; Tag 4: $p < 0,001$) ohne erkennbare Auswirkungen auf die Fluchtzeiten.

Am Tag nach dem letzten Lauf des *Acquisition Trainings* wurde ein *Probe Trial* durchgeführt, um das räumliche Bezugsgedächtnis der Tiere zu ermitteln. Im Alter von 4 Monaten verbrachten die Mäuse prozentual signifikant mehr Zeit im Zielquadranten als in den anderen drei Quadranten (Abbildung 13e, einfache Varianzanalyse, 4m: $p < 0,001$ Zielquadrant gegen den linken und gegenüberliegenden Quadranten, $p < 0,01$ Zielquadrant gegen den rechten Quadranten), was auf ein intaktes räumliches Bezugsgedächtnis schließen lässt. Die fünfmonatigen Mäuse hielten sich zwar signifikant länger im Zielquadranten auf als im linken und gegenüberliegenden Quadranten (einfache Varianzanalyse, 5m: $p < 0,05$), wiesen jedoch bereits Hinweise auf ein gestörtes Gedächtnis auf. Im Alter von 6 und 7 Monaten zeigten die Mäuse schließlich keine signifikanten Präferenzen für den Zielquadranten mehr, was bei diesen Tieren auf eine schwere Beeinträchtigung des räumlichen Bezugsgedächtnisses hinweist.

Wie schon an den vorangegangenen Tagen lagen die Schwimmgeschwindigkeiten bei den Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 6 Monaten unter denen ihrer vier- und siebenmonatigen Artgenossen (Abbildung 13f, einfache Varianzanalyse, 4m: $p < 0,01$; 7m: $p < 0,05$). Dies scheint jedoch keinen Einfluss auf die Quadrantenpräferenz zu haben.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen des *Probe Trials* lässt sich folgern, dass Störungen im räumlichen Bezugsgedächtnis bei homozygoten Tg4-42-Mäusen bereits im Alter von 5 Monaten beginnen und ab einem Alter von 6 Monaten ihre volle Ausprägung erlangen.

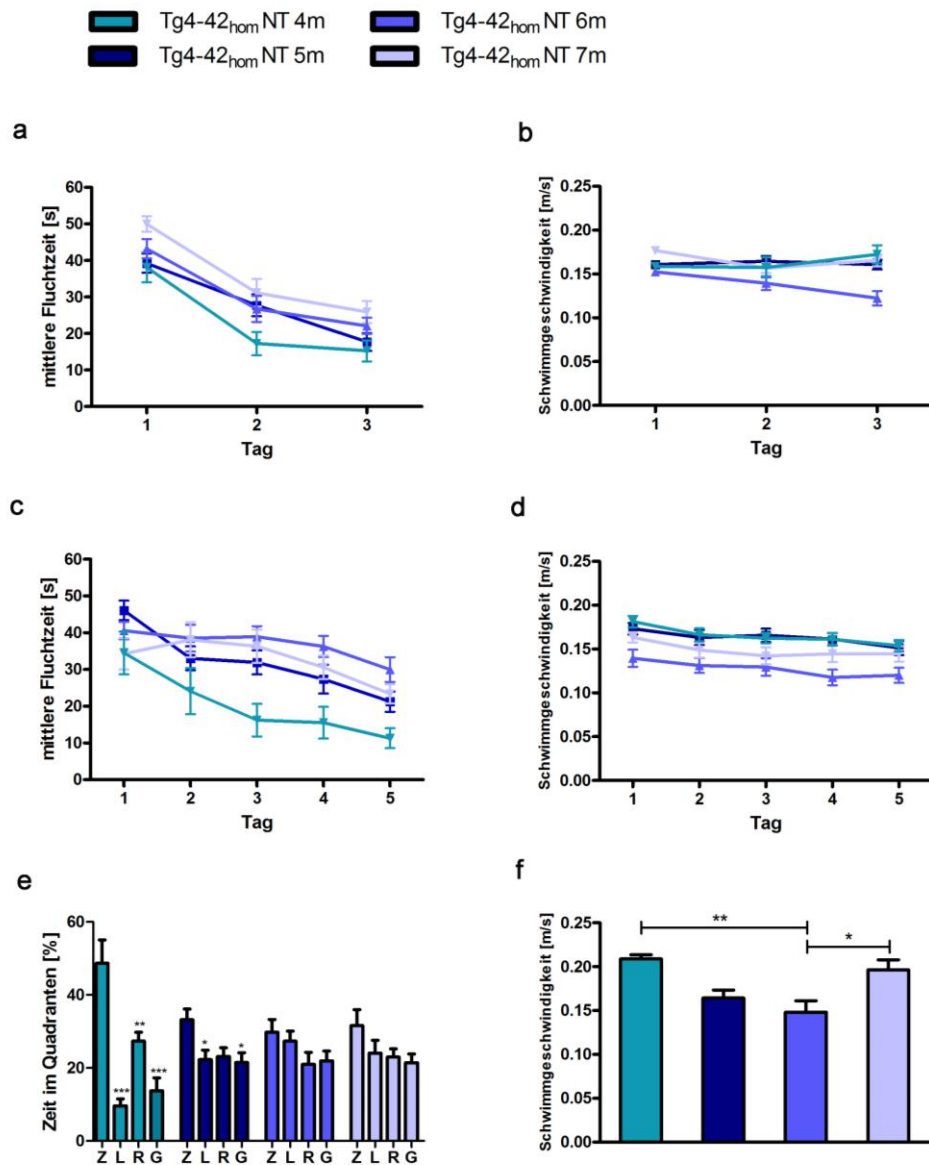


Abbildung 13: Altersabhängige Beeinträchtigungen des räumlichen Bezugsgedächtnisses im Morris Water Maze bei Tg4-42_{hom}-Mäusen.

Getestet wurden Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 4, 5, 6 und 7 Monaten. **a** Im *Cued Training* wurde gezeigt, dass die Mäuse über ein intaktes Sehvermögen und die nötigen motorischen Fähigkeiten verfügen, die dieser Test voraussetzt. Die Fluchtzeiten verringerten sich bei allen Tg4-42_{hom}-Mäusen signifikant innerhalb der 3 Tage des *Cued Trainings*. **c** Im *Acquisition Training* wurde getestet, ob die Mäuse zu räumlichem Lernen in der Lage sind. Innerhalb von fünf Testtagen sollten die Mäuse lernen, proximale und distale Hinweise zu nutzen, um eine unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform zu finden. Alle Tg4-42_{hom}-Mäuse reduzierten die Zeiten hierfür im Verlauf des *Acquisition Trainings*. **e** Im Anschluss an diese Lernphase absolvierten die Tg4-42_{hom}-Mäuse einen *Probe Trial*, der mögliche Defizite des räumlichen Bezugsgedächtnisses aufdecken sollte. Dafür wurde in einem Zeitraum von 60 Sekunden die Aufenthaltszeit in jedem der vier Quadranten aufgezeichnet. Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 4 Monaten zeigten eine klare Präferenz für den Zielquadranten, während sich bei den 5 Monate alten Tieren bereits leichte Störungen des räumlichen Bezugsgedächtnisses offenbarten. Bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 6 und 7 Monaten ließ sich keine Präferenz für den Zielquadranten mehr feststellen, was auf ein schwer beeinträchtigtes Lern-

verhalten hinwies. **b,d,f** Die Schwimmgeschwindigkeit der jeweiligen Gruppen bewegte sich in allen Versuchsteilen auf einem vergleichbaren Niveau, obwohl die Tiere im Alter von 6 Monaten durch eine an einigen Tagen signifikant verringerte Geschwindigkeit auffallen. $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$; Schwimmgeschwindigkeit und Fluchtzeit: Zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit Bonferroni-Korrektur, einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. Quadranten-Präferenz: Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. $n = 8-17$ pro Gruppe (4m: $n = 8$; 5m: $n = 16$; 6m: $n = 17$; 7m: $n = 9$). Z Zielquadrant, L linker Quadrant, R rechter Quadrant, G gegenüberliegender Quadrant. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; m = Monate. Abbildung modifiziert nach Antonios et al. (2015), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

3.2.4 Cross Maze im Altersverlauf

Das Cross Maze diente dazu herauszufinden, ob sich bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5, 6 und 7 Monaten Beeinträchtigungen des Arbeitsgedächtnisses zeigten. Hierfür wurde das Erkundungsverhalten vor dem Hintergrund untersucht, dass Mäuse eher dazu neigen, neue Arme zu erkunden, anstatt kürzlich besuchte Arme zu betreten (Absatz 2.3.5). Als Parameter diente dazu der erreichte Anteil an den theoretisch möglichen Armwechsellern in Prozent. Die Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 5, 6 und 7 Monaten zeigten vergleichbare Armwechsellern und keine signifikanten Abweichungen im Altersverlauf (Abbildung 14: einfache Varianzanalyse). Diese Daten sprechen für ein intaktes Arbeitsgedächtnis bei unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5 bis 7 Monaten.

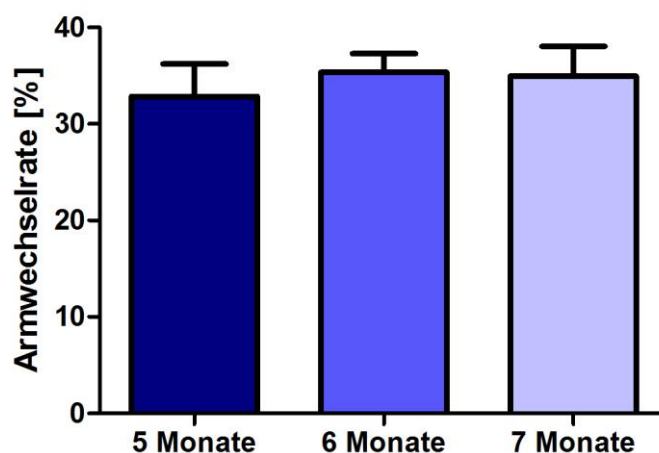


Abbildung 14: Unbeeinträchtigttes Arbeitsgedächtnis im Cross Maze bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Altersverlauf.

Keine der getesteten Tg4-42_{hom}-Gruppen im Alter von 5 bis 7 Monaten zeigte signifikante Abweichungen ihres Erkundungsverhaltens, was auf ein nicht geschädigtes Arbeitsgedächtnis hindeutet. $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$; Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. $n = 9-18$ pro Gruppe (5m: $n = 16$; 6m: $n = 18$; 7m: $n = 9$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

3.2.5 Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus im Altersverlauf

Um ein differenziertes Bild vom Verlauf des Nervenzellverlust in der hippocampalen CA1-Region homozygoter Tg4-42-Mäuse zu erhalten, wurden die Nervenzellen in dieser Region bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5, 6 und 7 Monaten mittels Design-basierter Stereologie quantifiziert. Diese Daten wurden dann mit den zuvor bereits ermittelten Nervenzellzahlen von Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 3, 4, und 8 Monaten sowie von drei- bzw. achtmonatigen Wildtyptieren verglichen (Absatz 2.5.3).

Die Design-basierte Stereologie offenbarte einen im Verlauf signifikanten Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei drei- bis achtmonatigen Tg4-42_{hom}-Mäusen (Einfache Varianzanalyse, Alter: $p < 0,0000001$). Im Alter von 3 und 4 Monaten war die Nervenzellzahl bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyptieren noch nicht signifikant verändert (Abbildung 15, Mittelwerte: WT 3m = 296.263, SEM \pm 7.532; Tg4-42_{hom} 3m = 304.705, SEM \pm 37.745; Tg4-42_{hom} 4m = 244.781, SEM \pm 5.399), wenngleich sich die Reduktion der Neuronenzahl bei viermonatigen Tg4-42_{hom}-Mäusen mit einem Verlust von durchschnittlich 17% im Vergleich zu dreimonatigen Wildtyptieren bereits andeutete.

Während Wildtyptiere auch mit 8 Monaten noch keine signifikanten Veränderungen ihrer Nervenzellzahl erkennen ließen (Mittelwert: WT 8m = 283.321, SEM \pm 9.423), zeigte sich bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5, 6, 7 und 8 Monaten ein signifikanter Neuronenverlust von im Mittel 44, 49, 51 und 64% (Abbildung 15, einfache Varianzanalyse, 5m, 6m, 7m und 8m: $p < 0,001$; Mittelwerte: Tg4-42_{hom} 5m = 165.709, SEM \pm 5.399; Tg4-42_{hom} 6m = 151.289, SEM \pm 4.543; Tg4-42_{hom} 7m = 143.901, SEM \pm 6.737; Tg4-42_{hom} 8m = 105.389, SEM \pm 16.960).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei Mäusen der Tg4-42_{hom}-Linie im Alter von 5 Monaten, möglicherweise sogar bereits mit 4 Monaten, einsetzt und dann kontinuierlich voranschreitet.

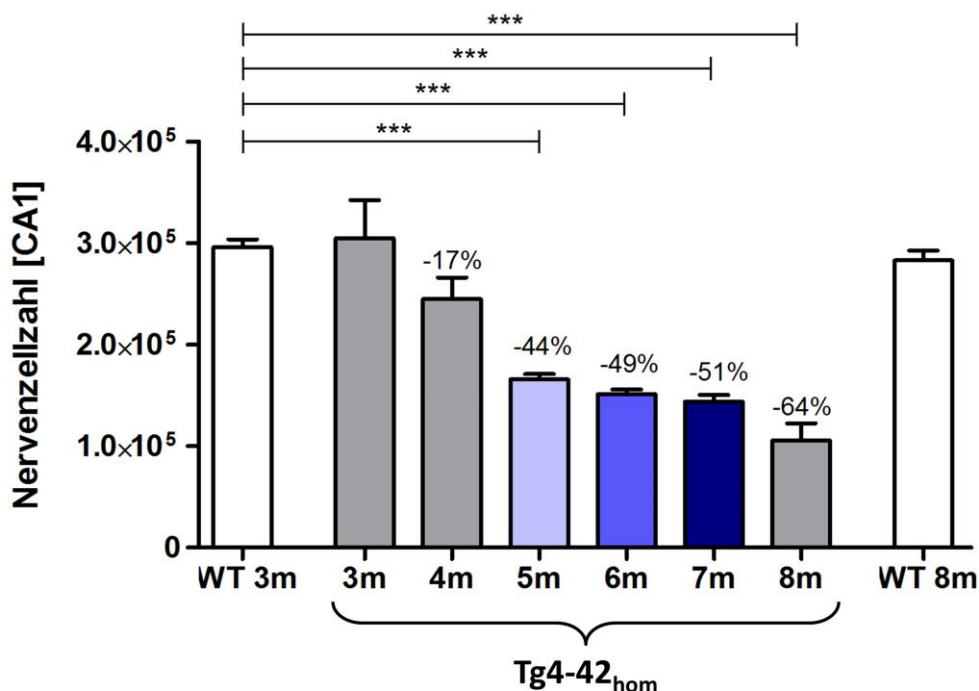


Abbildung 15: Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Altersverlauf.

Für die Quantifizierung einer Reduktion der Neuronenzahl im Altersverlauf wurde eine Design-basierte Stereologie durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Nervenzellverlust bei fünf- bis achtmonatigen Tg4-42_{hom}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren im Alter von 3 Monaten, was auf eine voranschreitende Nervenzellschädigung bzw. einen progredienten Untergang von Neuronen hindeutet. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. $n = 3-8$ pro Gruppe (WT 3m: $n = 6$, WT 8m: $n = 8$; Tg4-42_{hom} 3m: $n = 3$, Tg4-42_{hom} 4m: $n = 4$, Tg4-42_{hom} 5m: $n = 5$, Tg4-42_{hom} 6m: $n = 8$, Tg4-42_{hom} 7m: $n = 5$, Tg4-42_{hom} 8m: $n = 8$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM, WT = Wildtyp, m = Monate. Abbildung modifiziert nach Antonios et al. (2015), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

3.3 Behandlungsplan

Auf der Grundlage der im Morris Water Maze und in der Stereologie ermittelten Daten wurde als Beginn der Behandlung mit dem NT4X-Antikörper das Alter von 3 Monaten festgelegt, da zu diesem Zeitpunkt das räumliche Bezugsgedächtnis noch nicht beeinträchtigt und auch kein signifikanter Nervenzellverlust in der CA1-Region feststellbar war. Bei der Behandlung handelte es sich somit um eine präventive Strategie, bei der bereits vor dem Auftreten von Beeinträchtigungen mit der Therapie begonnen wurde, um Verhaltensdefizite sowie Nervenzellverlust zu verhindern bzw. abzumildern.

Über einen Zeitraum von 12 Wochen erhielt eine Gruppe von 15 Tg4-42_{hom}-Mäusen wöchentlich eine intraperitoneale Injektion mit NT4X. Einer weiteren Gruppe von 15 Tieren wurde Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) injiziert, um neben den unbehandelten Mäusen eine zweite Kontrollgruppe zu haben, die einen Handling-Effekt ausschließen soll-

te. Vor jeder Injektion wurden die Mäuse gewogen (Absatz 3.5.1), bevor eine mit 10 μl pro 1 g berechnete Dosis appliziert wurde. Der NT4X-Antikörper zur Injektion lag in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vor. Wenige Tage nach der neunten Injektion wurden die Mäuse in das Labor gebracht, um am Tag der zehnten Injektion mit den Verhaltenstests zu beginnen. Die elfte Dosis erhielten die Mäuse aufgrund von organisatorischen Aspekten der Verhaltenstests mit zwei Tagen Verspätung und die zwölfte dann wieder nach dem regulären Zeitplan (Abbildung 16). Kurz darauf wurden die Mäuse getötet und die Gehirne fixiert, um sie für verschiedene Färbungen und die Auswertung mittels Stereologie zu verwenden.

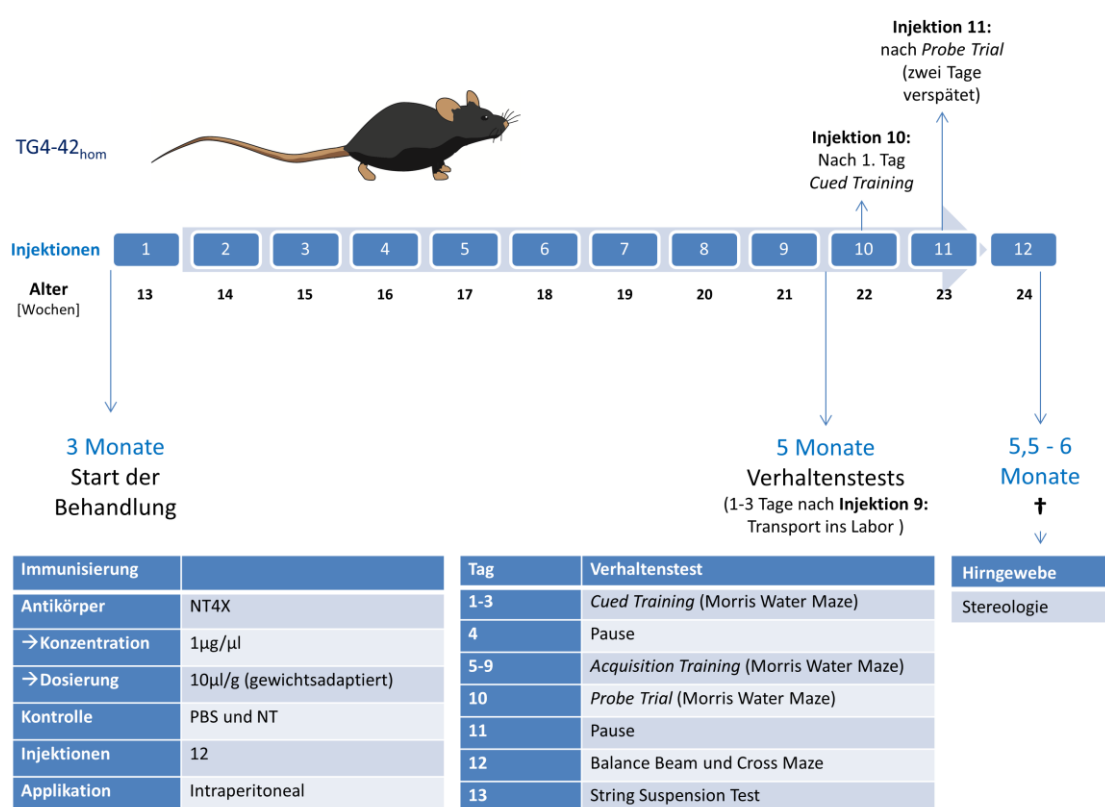


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Behandlungsplans für Tg4-42_{hom}-Mäuse.

3.4 Charakterisierung des NT4X-Antikörpers mit synthetischen Peptiden

Zur Evaluation der Bindungseigenschaften des in dieser Arbeit verwendeten NT4X-Antikörpers wurde ein Western Blot mit synthetischen Peptiden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Abbildung 17). Hierbei konnte eine deutliche Reaktivität des Antikörpers sowohl mit Monomeren, als auch mit Oligomeren bzw. niedermolekularen Aggregaten von N-terminal trunziertem $\text{A}\beta_{4-40}$, $\text{A}\beta_{4-42}$ sowie $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$, nachgewiesen werden. Es zeigte sich keine Affinität des Antikörpers zu $\text{A}\beta_{1-x}$ -Proteinvarianten, was mit den in der

Fachliteratur beschriebenen Eigenschaften von NT4X (Absatz 1.7.2.3) im Einklang steht und die Eignung des Antikörpers für die passive Immunisierung bestätigte.

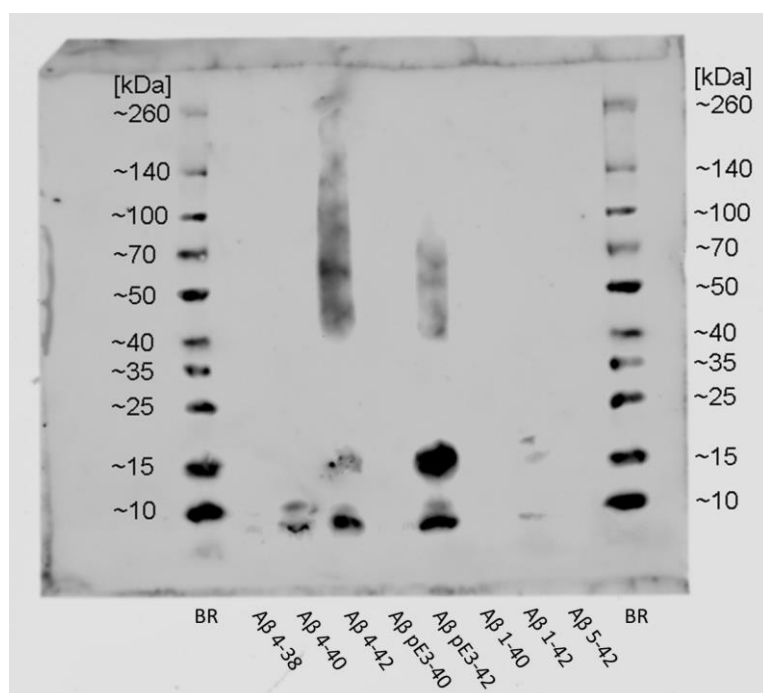


Abbildung 17: Bindungseigenschaften des Antikörpers NT4X im Western Blot mit synthetischen Peptiden.

BR = Broad Range Protein Ladder.

3.5 Behandelte Tiere im Vergleich

3.5.1 Gewichtsverlauf bei behandelten Mäusen

Über die gesamte Dauer der Behandlung war bei den Tg4-42_{hom}-Mäusen kein Abfall des Körpergewichtes zu beobachten, weder bei der Injektion mit NT4X noch bei der mit PBS (Abbildung 18a). Vielmehr stieg das Gewicht in beiden Gruppen im Mittel um mehr als 1 g an und unterschied sich am Ende der Behandlung nicht von dem der unbehandelten Mäuse gleichen Alters (Abbildung 18b, einfache Varianzanalyse). Dies lässt darauf schließen, dass die Behandlung gut vertragen wurde und keinen Einfluss auf die körperliche Entwicklung der Mäuse hatte.

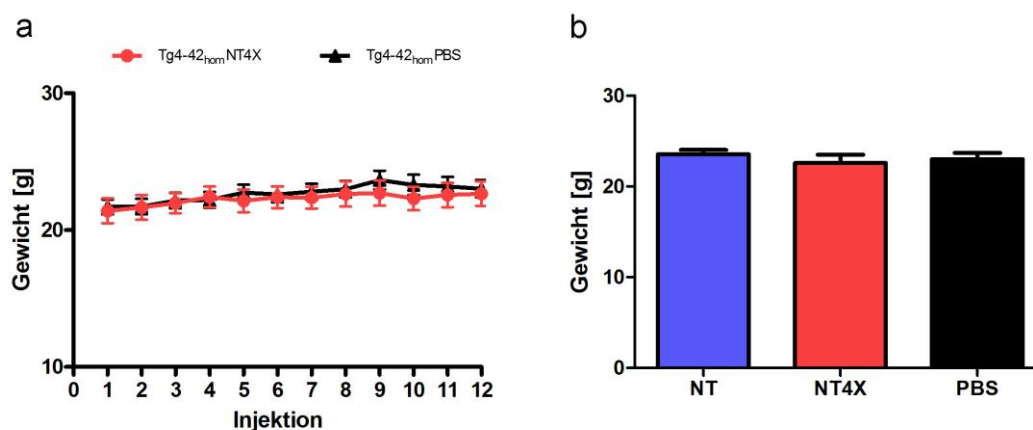


Abbildung 18: Unauffällige Gewichtsentwicklung der behandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse.

a Vor jeder Injektion mit NT4X oder PBS wurden die Mäuse gewogen. Das Gewicht stieg bei beiden Gruppen im Verlauf von 12 Wochen leicht an. **b** Die behandelten Mäuse erreichten im Alter von 6 Monaten ein Endgewicht, das keine signifikanten Abweichungen vom Gewicht gleichaltriger un behandelter Mäuse aufwies. Diese Ergebnisse weisen auf eine normale körperliche Entwicklung hin. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; $n = 15-17$ pro Gruppe (Tg4-42_{hom} NT: $n = 17$, Tg4-42_{hom} NT4X: $n = 15$; Tg4-42_{hom} PBS: $n = 15$). Endgewicht: Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

3.5.2 Morris Water Maze bei behandelten Mäusen

Im Altersverlauf zeigten un behandelte Tg4-42_{hom}-Mäuse ab einem Alter von 5 Monaten leichte und mit 6 Monaten schwere Beeinträchtigungen ihres räumlichen Bezugsgedächtnisses (Absatz 3.2.1). Deshalb wurden nun Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 6 Monaten getestet, die in den vorangegangenen 12 Wochen einmal wöchentlich mit NT4X behandelt worden waren (Abbildung 16), um das präventive bzw. therapeutische Potenzial von NT4X im Hinblick auf Verhaltensdefizite von Tg4-42_{hom}-Mäusen zu eruieren. Als Kontrollen dienen eine Gruppe Tg4-42_{hom}-Mäuse, die nach gleichem Schema PBS anstatt des Antikörpers erhalten hatten, sowie eine un behandelte Gruppe desselben Alters.

Im zunächst durchgeführten *Cued Training* zeigten alle Gruppen über die drei Testtage verbesserte Fluchtzeiten (Abbildung 19a, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, NT, NT4X, PBS: Haupteffekt der Tage: $p < 0,0000001$) und vergleichbare Schwimmgeschwindigkeiten (zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, NT, NT4X, PBS: Haupteffekt der Gruppe: $p = 0,024449$), wobei die mit PBS behandelten Tiere am 3. Tag signifikant schneller schwammen als die un behandelten Mäuse (Abbildung 19b, einfache Varianzanalyse, NT $p < 0,05$). Alle Mäuse verfügten folglich über die für den Test notwendigen visuellen und motorischen Fähigkeiten.

Daraufhin absolvierten die Mäuse das *Acquisition Training*, in dem ebenfalls alle getesteten Gruppen ihre Fluchtzeiten innerhalb des Zeitraums von 5 Tagen reduzieren konnten

(Abbildung 19c, zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, NT, NT4X, PBS: Haupteffekt der Tage: $p < 0,0000001$).

Bei den Schwimgeschwindigkeiten im *Acquisition Training* zeigte sich ein Gruppeneffekt (zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen, NT, NT4X, PBS: Haupteffekt der Gruppe: $p = 0,024737$), welcher auf das schnellere Schwimmen der mit PBS behandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse im Vergleich zur Tg4-42_{hom}-NT4X-Gruppe an den Tagen 2 und 3 zurückzuführen ist (Abbildung 19d, einfache Varianzanalyse, $p < 0,05$). Auch hier brachte die Schwimgeschwindigkeit keinen Vorteil für die Fluchtzeiten.

Im *Probe Trial* zeigten weder die unbehandelten, noch die mit PBS behandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse eine signifikante Präferenz für den Zielquadranten. Demgegenüber verbrachten die Mäuse, die NT4X erhalten hatten, signifikant mehr Zeit im Zielquadranten (Abbildung 19e, einfache Varianzanalyse, NT4X: $p < 0,001$ Zielquadrant gegen rechten und gegenüberliegenden Quadranten, $p < 0,01$ Zielquadrant gegen linken Quadranten) und offenbarten somit ein intaktes Lernverhalten. Wie zuvor schwammen auch hier die Tg4-42_{hom}-PBS-Mäuse schneller als die anderen Gruppen (Abbildung 19f, einfache Varianzanalyse, NT4X und NT: $p < 0,01$), was sich abermals nicht im Testerfolg widerspiegelte.

Aus den Daten des *Probe Trials* lässt sich folgern, dass der NT4X-Antikörper bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 6 Monaten das räumliche Bezugsgedächtnis vor Beeinträchtigungen bewahrt.

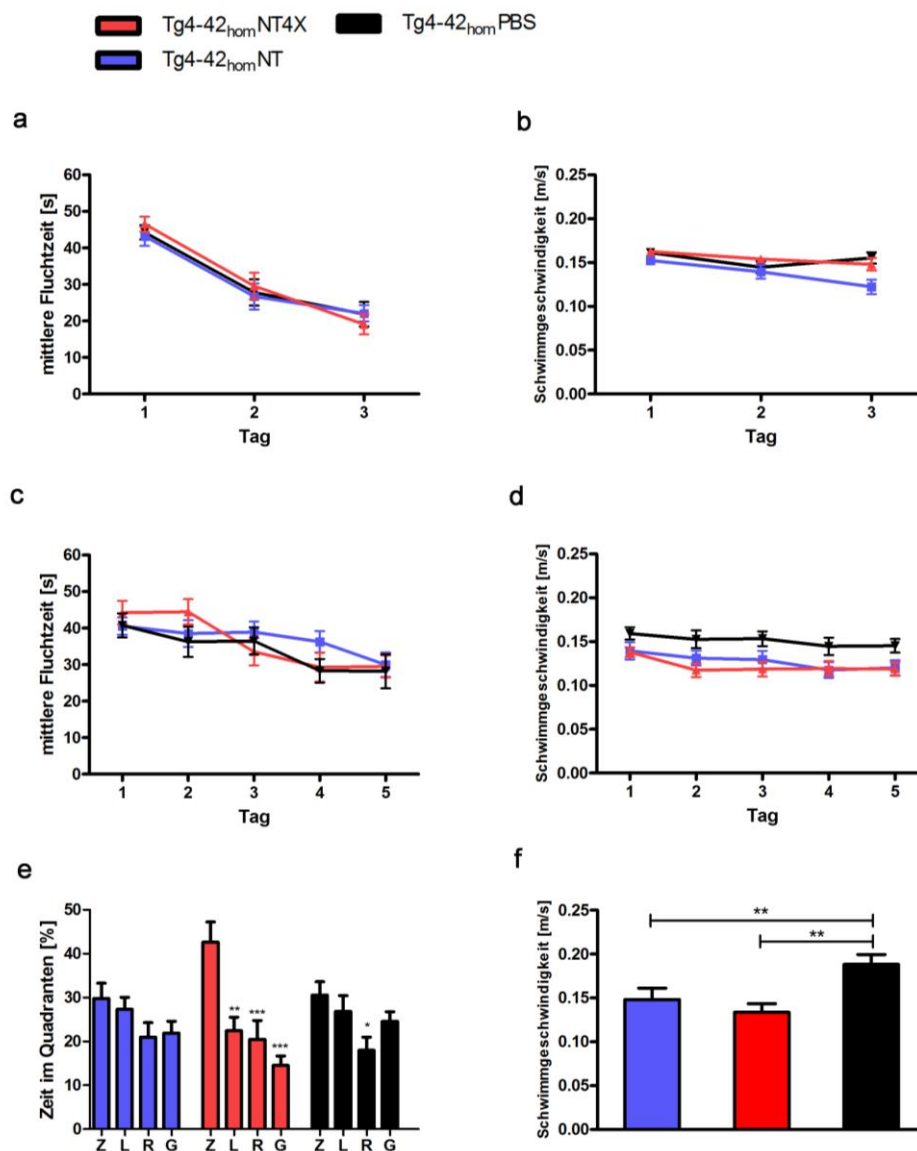


Abbildung 19: Verbesserung des Lernverhaltens im Morris Water Maze durch die passive Immunisierung mit NT4X bei Tg4-42_{hom}-Mäusen.

Getestet wurden Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 6 Monaten, die über einen Zeitraum von 12 Wochen wöchentliche Injektionen mit NT4X bzw. mit PBS erhalten hatten. Als Vergleich dienen unbehandelte Tg4-42_{hom} Tiere desselben Alters. **a** Im *Cued Training* zeigten die Mäuse ein intaktes Sehvermögen und ausreichende motorische Fähigkeiten für die Bewältigung des Tests. Die Fluchtzeiten verringerten sich bei allen Gruppen signifikant innerhalb der 3 Tage des *Cued Trainings*. **c** Das räumliche Lernen der Mäuse mit proximalen und distalen Hinweisen wurde mithilfe des *Acquisition Trainings* untersucht. Auch hier verbesserten alle Gruppen ihre Fluchtzeiten innerhalb der fünf Testtage. **e** Im *Probe Trial* wurden die Mäuse auf Beeinträchtigungen des räumlichen Bezugsgedächtnisses getestet. Sowohl die unbehandelten als auch die mit PBS behandelten Mäuse zeigten in den 60 Sekunden des *Probe Trials* keine signifikante Präferenz für den Zielquadranten und somit Zeichen eines gestörten Lernverhaltens. Demgegenüber verbrachten die mit NT4X passiv immunisierten Tg4-42_{hom}-Mäuse signifikant mehr Zeit im Zielquadranten, was auf ein intaktes räumliches Bezugsgedächtnis hinweist. **b,d,f** An einigen Versuchstagen zeigten die mit PBS behandelten Tiere eine signifikant erhöhte Schwimmgeschwindigkeit, was sich jedoch nicht in verbesserten Fluchtzeiten

oder einer höheren Zielquadranten-Präferenz widerspiegelte. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Schwimmgeschwindigkeit und Fluchtzeit: zweifache Varianzanalyse mit Messwiederholungen mit Bonferroni-Korrektur, einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. Quadranten-Präferenz: Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. $n = 15-17$ pro Gruppe (Tg4-42_{hom} NT: $n = 17$, Tg4-42_{hom} NT4X: $n = 15$; Tg4-42_{hom} PBS: $n = 15$). Z Zielquadrant, L linker Quadrant, R rechter Quadrant, G gegenüberliegender Quadrant. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; NT=*non-treated* (unbehandelt), m = Monate. Abbildung modifiziert nach Antonios et al. (2015), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

3.5.3 Weitere Verhaltenstests bei behandelten Mäusen

Die weiteren Verhaltenstests dienten nur als Kontrollexperimente, da die unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 6 Monaten keine signifikanten Einschränkungen offenbart hatten. Erwartungsgemäß erbrachte keiner dieser Tests (Abbildung 20 a-c: Cross Maze, Balance Beam-Test und String Suspension-Test) signifikante Unterschiede zwischen den mit NT4X behandelten Tg4-42_{hom}-Mäusen und den mit PBS injizierten bzw. unbehandelten Tieren. Eine Ausnahme bildet im String Suspension-Test die Tg4-42_{hom}-PBS-Gruppe, die den Test im Vergleich zu der Tg4-42_{hom}-NT4X-Gruppe signifikant besser absolvierte (Abbildung 20c: einfache Varianzanalyse: $p < 0,05$). In Zusammenschau der Testergebnisse ist diese Abweichung allerdings am ehesten als unspezifisch zu bewerten, da sich keine Signifikanzen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe ergaben.

Im Claspings-Test zeigten sich keine Auffälligkeiten (Graph nicht gezeigt).

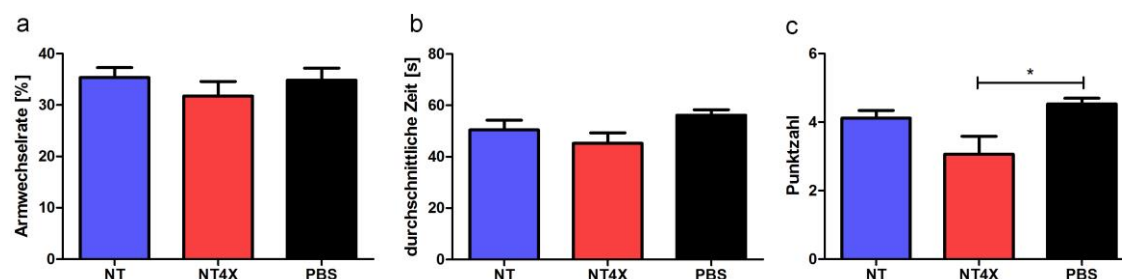


Abbildung 20: Weitere Verhaltenstests der mit NT4X bzw. PBS behandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse.

a Im Cross Maze fand sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. $n = 15-18$ pro Gruppe (Tg4-42_{hom} NT: $n = 18$, Tg4-42_{hom} NT4X: $n = 15$; Tg4-42_{hom} PBS: $n = 15$). **b,c** Auch im Balance Beam-Test (**b**) waren keine signifikant abweichenden motorischen Fähigkeiten zu erkennen, während die mit PBS behandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse im String Suspension-Test (**c**) im Vergleich zu den mit NT4X Behandelten signifikant bessere Testergebnisse zeigten. $n = 15-17$ pro Gruppe (Tg4-42_{hom} NT: $n = 17$, Tg4-42_{hom} NT4X: $n = 15$; Tg4-42_{hom} PBS: $n = 15$). *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

3.5.4 Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus bei behandelten Mäusen

Nachdem die mit dem NT4X-Antikörper behandelten Tg4-42_{hom}-Mäuse im Morris Water Maze im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant verbesserte Testergebnisse gezeigt hatten (Absatz 3.5.1), wurden mithilfe der Design-basierten Stereologie mögliche Auswirkungen der Behandlung auf die Anzahl an Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus untersucht. Dafür wurde die Neuronenzahl dieser Region bei den mit NT4X bzw. PBS behandelten Tieren im Alter von 6 Monaten mit unbehandelten gleichaltrigen Tg4-42_{hom}-Mäusen verglichen.

Es zeigte sich ein signifikanter Behandlungseffekt zwischen den Gruppen (Abbildung 21, Einfache Varianzanalyse, Gruppe: $p = 0,002857$). Die Nervenzellzahl bei der Tg4-42_{hom}-NT4X-Gruppe lag hierbei signifikant höher als die der beiden Kontrollgruppen (Abbildung 21, Einfache Varianzanalyse, Tg4-42_{hom} PBS: $p < 0,05$, Tg4-42_{hom} NT: $p < 0,01$). Das entspricht einem Unterschied von im Mittel etwa 12% im Vergleich zu den mit PBS behandelten und 13% im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen (Mittelwerte: Tg4-42_{hom} NT4X = 170.956, SEM \pm 3.414; Tg4-42_{hom} PBS = 153.081, SEM \pm 4.500; Tg4-42_{hom} NT = 151.289, SEM \pm 4.543). Für die beiden Kontrollgruppen waren untereinander keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Im Altersvergleich offenbarten die mit NT4X behandelten Tiere im Alter von 6 Monaten somit durchschnittlich sogar höhere Neuronenzahlen als ihre fünfmonatigen unbehandelten Artgenossen (Absatz 3.2.5, Mittelwert: Tg4-42_{hom} 5m = 165.709, SEM \pm 5.399).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Verabreichung des NT4X-Antikörpers den Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei Tg4-42_{hom}-Mäusen deutlich abschwächen bzw. hinauszögern kann.

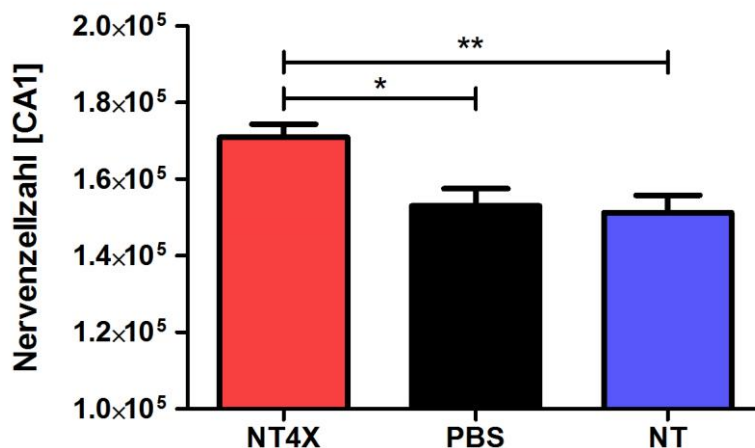


Abbildung 21: Reduktion des Nervenzellverlustes in der hippocampalen CA1-Region bei Tg4-42_{hom}-Mäusen durch die passive Immunisierung mit NT4X.

Mithilfe der Stereologie wurden mögliche positive Effekte der Behandlung mit NT4X auf den Nervenzellverlust bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 6 Monaten beurteilt. Hierbei zeigte sich bei den Tieren, die den Antikörper erhalten hatten, im Vergleich zu gleichaltrigen mit PBS behandelten bzw. unbehandelten Tg4-42_{hom}-Mäusen eine signifikant höhere Neuronenzahl, was für eine protektive Wirkung durch NT4X spricht. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur. $n = 8-15$ pro Gruppe (Tg4-42_{hom} NT4X: $n = 15$, Tg4-42_{hom} PBS: $n = 15$, Tg4-42_{hom} NT: $n = 8$). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. Abbildung modifiziert nach Antonios et al. (2015), die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

4 Diskussion

4.1 Die Expression von $A\beta_{4-42}$ führt bei Tg4-42_{hom}-Mäusen altersabhängig zu Nervenzellverlust und Verhaltensdefiziten

Der Morbus Alzheimer mit seinen ausgiebig untersuchten histopathologischen Merkmalen aus Amyloid-Plaques, Neurofibrillenbündeln, reaktiver Entzündung und Gliose sowie dem Verlust von Neuronen und Synapsen, lässt sich gut mithilfe transgener Tiermodelle erforschen. Für diese Modelle werden vorwiegend Mäuse verwendet, da diese Spezies wegen ihrer relativ kurzen Lebensspanne und der vergleichsweise geringen Kosten sowie aufgrund der für diese Art intensiv erforschten Techniken zur genetischen Modifikation besonders geeignet ist (Elder et al. 2010). Für die Generierung transgener Mausmodelle wurden zunächst die für die familiäre Form des Morbus Alzheimer (FAD) verantwortlichen Gene identifiziert und in das Erbgut der Mäuse integriert. Dadurch entstanden einfach transgene Tiermodelle für mutierte APP- oder Präsenilin-Gene, die verschiedene histopathologische und verhaltensbezogene Auffälligkeiten aufwiesen (Games et al. 1995; Hsiao et al. 1996; Duff et al. 1996; Guo et al. 1999). Viele dieser Modelle offenbarten eine ausgeprägte Ablagerung von $A\beta$ in Form extrazellulärer Plaques. Aufgrund der wachsenden Evidenz für die untergeordnete Rolle extrazellulärer Plaques in der Alzheimer-Pathogenese sowie für die fehlende Korrelation zwischen Amyloid-Plaques und der für den Morbus Alzheimer typischen Symptomatik (Perrin et al. 2009; Benilova et al. 2012), ist die Aussagekraft dieser Modelle als eingeschränkt zu bewerten. Infolgedessen entstanden mehrfach transgene Mausmodelle, mit denen schließlich neben zahlreichen anderen Alzheimer-typischen Pathologien auch ein signifikanter Nervenzellverlust hervorgerufen werden konnte, was sich zunächst beispielsweise bei transgenen Tg2576- und PDAPP-Mäusen als problematisch erwiesen hatte (Irizarry et al. 1997a; Irizarry et al. 1997b; Wirths und Bayer 2010). So offenbaren Mäuse aus der APP/PS1KI-Linie einen Neuronenverlust von über 50% in der CA1- und CA2-Region des Hippocampus (Casas et al. 2004), während bei 5xFAD-Mäusen die neokortikale Lamina V betroffen ist. Darüber hinaus zeigen weitere Mausmodelle eine signifikante Neurodegeneration (Wirths und Bayer 2010). Die meisten dieser Modelle bieten aufgrund der artifiziell entstandenen und bisweilen recht willkürlichen Kombinationen verschiedener FAD-Mutationen zwar eine große Bandbreite morphologischer, kognitiver und motorischer Pathologien, können jedoch deren Auftreten bei humanen Alzheimer-Patienten häufig nicht adäquat widerspiegeln. Beispielsweise werden die bei Alzheimer-Patienten zahlreich vorhandenen N-terminal trunkeerten $A\beta$ -Isoformen nur selten in angemessener Ausprägung exprimiert und das in Amyloid-Plaques vorherrschende $A\beta_{1-42}$ stellt in diesen Modellen häufig eine sehr dominante Fraktion dar. Darüber hinaus macht die familiäre Form des Morbus Alzheimer mit einer Prävalenz von unter 0,1% nur einen

sehr geringen Teil der Alzheimer-Erkrankungen beim Menschen aus, was die Aussagekraft von FAD-Mausmodellen für die Mehrzahl der Patienten deutlich einschränkt (Harvey et al. 2003; Blennow et al. 2006).

Vor dem Hintergrund der sich verdichtenden Evidenz für N-trunkierte A β -Peptide als bestimmende Unterformen im Gehirn von Alzheimer-Patienten und für lösliche Oligomere als Hauptfaktoren in der Pathogenese der Erkrankung sowie bei der Induktion der Neurodegeneration (Benilova et al. 2012; Bayer und Wirths 2014), trat die Entwicklung transgener Mausmodelle für diese Konstellationen in den Vordergrund und es wurden von FAD-Mutationen unabhängige Mausmodelle entwickelt. Dabei wurde das Hauptaugenmerk zunächst auf die Untersuchung von A β_{pE3-42} gelegt, das 1992 erstmals nachgewiesen werden konnte und eine der dominanten A β -Varianten im Gehirn von Alzheimer-Patienten darstellt (Mori et al. 1992; Saido et al. 1995; Wirths et al. 2010a). Es wurden transgene Mausmodelle wie das TBA2- und das TBA42-Modell generiert, um die neurotoxischen Auswirkungen dieser Isoform *in vivo* zu analysieren. Bei diesen Tieren kommt es zu ausgeprägten phänotypischen Verhaltensdefiziten und motorischen Beeinträchtigungen, die auf die intraneuronale Akkumulation der A β_{pE3-42} -Peptide mit konsekutiver Neurodegeneration zurückzuführen sind (Wirths et al. 2009; Wittnam et al. 2012).

A β_{4-42} wurde als Angriffspunkt für eine medikamentöse Therapie hingegen lange vernachlässigt, weshalb zunächst kein entsprechendes Tiermodell entwickelt wurde, um die Auswirkungen dieser Peptidvariante zu analysieren. Von Masters et al. 1985 entdeckt und erstmals isoliert, wurde A β_{4-42} in vergleichsweise hoher Konzentration im Gehirn von Patienten mit Morbus Alzheimer oder vaskulärer Demenz gefunden und als eine der häufigsten A β -Varianten im Gehirn von Alzheimer-Patienten identifiziert (Lewis et al. 2006; Portelius et al. 2010). Aufgrund zahlreicher Belege für die hohe Relevanz dieser Isoform in der Alzheimer-Pathogenese wurde die Tg4-42-Linie als erstes selektives Mausmodell für A β_{4-42} generiert. Das Besondere am Tg4-42-Mausmodell ist, dass ein signifikanter Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus und damit einhergehend gravierende Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis nur durch die Expression und die intraneuronale Akkumulation von A β_{4-42} hervorgerufen werden (Bouter et al. 2013). Da hierfür keine FAD-Mutationen nötig sind, kann die Tg4-42-Linie als ein Modell für die deutlich häufigere sporadische Form des Morbus Alzheimer angesehen werden, auch wenn einige für diese Erkrankung charakteristische Pathologien wie Amyloid-Plaques oder Neurofibrillenbündel aus dem Tau-Protein hier fehlen (Bouter 2014). Damit bietet das Tg4-42-Mausmodell die Möglichkeit, selektiv die neurotoxischen Effekte von A β_{4-42} im Altersverlauf und deren Beeinflussbarkeit durch eine medikamentöse Therapie mit Antikörpern wie NT4X *in vivo* zu untersuchen. Das beeinträchtigte räumliche Bezugsgedächtnis von Tg4-42-Mäusen fällt bei heterozygoten Tieren im Alter von 12 Monaten auf und wird von einer bereits bei achtmonatigen Mäusen zu erkennenden signifikanten Reduktion der Neuronenzahl in der

CA1-Region begleitet (Bouter et al. 2013). Demgegenüber wurde gezeigt, dass homozygote Tg4-42-Mäuse im Vergleich zu ihren heterozygoten Artgenossen einen schwereren Verlauf aufweisen und im Morris Water Maze bereits im Alter von 8 Monaten deutliche Beeinträchtigungen des räumlichen Bezugsgedächtnisses offenbaren, was mit einer Verringerung der Nervenzellzahl in der CA1-Region um über 60% einhergeht. Im Alter von 3 Monaten zeigen beide Gruppen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren noch keine Auffälligkeiten (Bouter et al. 2013). Da diese Daten den genauen Zeitpunkt für das Auftreten der Verhaltensdefizite und deren Korrelat in der Neuronenzahl nicht hinreichend spezifizieren, wurde in dieser Arbeit versucht, bei den im Vergleich zu heterozygoten Tieren schwerer betroffenen Tg4-42_{hom}-Mäusen den genauen Zeitpunkt für den Beginn dieser Beeinträchtigungen zu ermitteln.

Das Morris Water Maze wurde 1984 entwickelt und gilt als eines der besten Verfahren zur Untersuchung von räumlichem Lernen und Gedächtnis (Morris 1984; D'Hooge und DeDeyn 2001). Das *Acquisition Training* mit einer unter der Wasseroberfläche verborgenen Plattform und der *Probe Trial* mit entfernter Plattform stellen relativ spezifische Tests für die Funktionalität der Hippocampusformation dar, werden jedoch auch durch Schäden in anderen Hirnregionen wie dem Striatum, dem basalen Vorderhirn, dem Kleinhirn sowie in verschiedenen neokortikalen Bereichen beeinflusst (D'Hooge und DeDeyn 2001). Ratten mit geschädigtem Hippocampus können im Water Maze eine sichtbare Plattform mühelos finden, während sie nicht in der Lage sind, eine Art kognitive Karte zu erzeugen, um zu einer verborgenen Plattform zu navigieren (Pearce et al. 1998). Dabei ist das Morris Water Maze in der Lage, zwischen räumlichem Lernen und räumlichem Bezugsgedächtnis zu differenzieren (Vorhees und Williams 2006; Puzzo et al. 2014). Die in dieser Arbeit getesteten Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 4 Monaten erzielten in Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen im *Acquisition Training* deutlich bessere Ergebnisse als ihre älteren Artgenossen, was auf ein besseres räumliches Lernen schließen lässt. Auch im *Probe Trial* waren die jüngeren Mäuse den Älteren überlegen und offenbarten damit ein besser funktionierendes räumliches Bezugsgedächtnis. Damit zeigen Tg4-42_{hom}-Mäuse im Morris Water Maze ähnliche altersabhängige Beeinträchtigungen wie Tiere aus vielen anderen transgenen Alzheimer-Mausmodellen wie dem 5xFAD-Modell (Bouter et al. 2014), dem PDAPP-Modell (Chen et al. 2000), dem APP/PS1-Modell (Trinchese et al. 2004) oder dem Tg2576-Modell (Kishimoto et al. 2013).

Motorische Probleme oder eine gestörte körperliche Entwicklung als Erklärung für diese Ergebnisse lassen sich vor dem Hintergrund einer normalen Gewichtsentwicklung und unauffälliger Motoriktests im Balance Beam- und String Suspension-Test sowie einer normalen Performance im *Cued Training* ausschließen. Dabei dient das *Cued Training* vornehmlich der Bestätigung ausreichender visueller und motorischer Fähigkeiten für die Bewältigung des Tests. Die zum Teil zwischen den Gruppen divergierenden Schwimmgeschwin-

digkeiten im Morris Water Maze hatten bei den getesteten Gruppen keinen erkennbaren Einfluss auf die Fluchtzeiten.

Die Beeinträchtigungen im Morris Water Maze lassen bei Tg4-42_{hom}-Mäusen auf eine progrediente hippocampale Schädigung schließen, die mittels Stereologie bestätigt werden sollte.

Für den Zusammenhang zwischen der Anzahl der Neuronen im Hippocampus, insbesondere in der bei Alzheimer-Patienten besonders betroffenen hippocampalen CA1-Region, und dem räumlichen Bezugsgedächtnis gibt es zahlreiche Belege. So zeigten Ratten mit einer bilateralen Läsion des dorsalen Hippocampus, die 30-50% des Gesamtvolumens umfasste, bereits Störungen im räumlichen Bezugsgedächtnis, die sich im Morris Water Maze bei der Ausdehnung der Läsionen von 50% bis 100% entsprechend aggravierten (Broadbent et al. 2004). Moser et al. (1995) gehen davon aus, dass nur etwa 20-40% des gesamten Hippocampus für ein funktionierendes räumliches Lernen notwendig sind. Insgesamt ergibt sich aus diesen Ergebnissen ein Bild, nach dem der Hippocampus die entscheidende Struktur für das räumliche Bezugsgedächtnis darstellt, Schäden in dieser Region jedoch ziemlich lange kompensiert werden können und messbare Beeinträchtigungen erst bei ausgedehnten Läsionen zu erkennen sind.

Die mithilfe von Design-basierter Stereologie ermittelten Nervenzellzahlen in der CA1-Region des Hippocampus von im Morris Water Maze getesteten Tg4-42_{hom}-Mäusen sind mit diesen Erkenntnissen vereinbar. So sorgt ein signifikanter Nervenzellverlust von etwa 44% bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Alter von 5 Monaten im Morris Water Maze bereits für Beeinträchtigungen im räumlichen Bezugsgedächtnis, eine Präferenz für den Zielquadranten im *Probe Trial* ist bei diesen Mäusen allerdings noch erkennbar. Im Alter von 6 Monaten erfahren die Beeinträchtigungen der Tg4-42_{hom}-Mäuse schließlich ihre volle Ausprägung. Diese Mäuse zeigen dabei im *Probe Trial* keine signifikante Bevorzugung des Zielquadranten mehr, was auf ein schwer gestörtes räumliches Bezugsgedächtnis zurückzuführen ist. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits etwa 49% der Nervenzellen in der CA1-Region des Hippocampus zugrunde gegangen.

Aus der Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich schließen, dass eine Reduktion der Nervenzellzahl in der CA1-Region des Hippocampus um knapp 50% bei Tg4-42_{hom}-Mäusen die kritische Grenze für ein funktionierendes räumliches Bezugsgedächtnis darstellt.

Daneben ist bei den Tg4-42_{hom}-Mäusen das mithilfe des Cross Maze untersuchte Arbeitsgedächtnis von der Symptomatik nicht betroffen.

Die unauffälligen Ergebnisse könnten durch die bei Tg4-42_{hom}-Mäusen geringer ausgeprägte Schädigung von Hirnregionen außerhalb der hippocampalen CA1-Region zu erklären sein. So sind bei einem normalen Erkundungsverhalten von Mäusen im Cross Maze neben

der Hippocampusformation auch Bereiche in weiteren Hirnregionen wie dem präfrontalen Kortex, dem basalen Vorderhirn, dem Thalamus, dem dorsalen Striatum sowie Teilen des vestibulären Systems und des Kleinhirns involviert (Lalonde 2002; Wietrzych et al. 2005). Möglicherweise wird die lokal begrenzte und relativ spezifische Schädigung der CA1-Region des Hippocampus bei Tg4-42_{hom}-Mäusen durch die anderen Bereiche kompensiert. Außerdem ist eine fehlerhafte Abbildung des Arbeitsgedächtnisses der Tg4-42_{hom}-Mäuse durch das Cross Maze zu diskutieren. So zeigen beispielsweise Tiere nach Hippocamppektomie eine starke Seitenpräferenz, durch die sie jeweils den nächsten Arm aufsuchen und somit trotz geschädigten Arbeitsgedächtnisses sehr hohe Werte für die Armwechselrate erzielen (Deacon und Rawlins 2006).

4.2 Zeitpunkt der Behandlung und Dosierung von NT4X

Die CA1-Region des Hippocampus weist bei Alzheimer-Patienten einen ausgedehnten Nervenzellverlust auf, was beim normalen Altern nicht auftritt und daher als spezifisch für neurodegenerative Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer anzusehen ist (West et al. 1994). Allerdings zeigt sich dieser Untergang von Neuronen im präklinischen Stadium noch nicht (West et al. 2004). Auch im transgenen Tg4-42-Mausmodell ist ein massiver Nervenzellverlust in dieser Region zu erkennen. Da die Degeneration von Neuronen bei fünfmonatigen Tg4-42_{hom}-Mäusen hochsignifikant ist und bei Tieren im Alter von 4 Monaten bereits ein Rückgang der Zellzahl um etwa 17% zu erkennen ist, bietet sich bei viermonatigen Tg4-42_{hom}-Mäusen ein günstiger Zeitpunkt für die therapeutische Intervention. Außerdem verfügen diese Tiere noch über ein intaktes räumliches Bezugsgedächtnis. In verschiedenen Studien konnten sowohl die aktive, als auch die passive Immuntherapie zur Reduktion der A β -Belastung in transgenen APP-Mausmodellen die größte Effektivität entfalten, wenn sie präventiv durchgeführt wurden (Demattos et al. 2012). Bei älteren Mäusen mit bereits bestehenden Ablagerungen war die Therapie hingegen beispielsweise bei Tg2576-Mäusen nur schwach wirksam oder blieb gar ohne jeglichen Effekt (Das et al. 2001; Levites et al. 2006). Für die Antikörpertherapie erschien es daher sinnvoll, einen präventiven Ansatz der therapeutischen Intervention bei bereits bestehender Pathologie vorzuziehen. Die passive Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper bei Tg4-42_{hom}-Mäusen wurde folglich im Alter von 3 Monaten begonnen, da die Mäuse in diesem Alter im Vergleich zu Wildtyp-Tieren noch keine Unterschiede im Sinne verschiedener Beeinträchtigungen aufweisen.

Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob die Neurodegeneration und die Verhaltensdefizite durch die präventive Behandlung mit NT4X abgeschwächt werden können. Bei einer Behandlungsdauer von 12 Wochen wurde das Alter von 6 Monaten als Endpunkt festgelegt. In diesem Alter zeigte sich bei Tg4-42_{hom}-Mäusen in der CA1-Region ein ausgehnter Nervenzellverlust von fast 50%, der mit schweren Beeinträchtigungen im räumlichen Bezugsgedächtnis einherging (Absatz 4.1). Daher war dieser Endpunkt für die Unter-

suchung der möglicherweise protektiven Auswirkungen einer Antikörpertherapie mit NT4X geeignet.

In dieser Arbeit wurde der NT4X-Antikörper für die intraperitoneale Injektion in einer Konzentration von 1 μg pro μl verwendet. Hiervon erhielten die Tg4-42_{hom}-Mäuse wöchentlich gewichtsadaptiert 10 μl pro Gramm Körpergewicht, was einer Antikörperdosis von 10 mg/kg und bei einem Körpergewicht von etwa 22 g pro Maus einer Dosis von 220 μg pro Woche entspricht. In diversen Studien zur passiven Immunisierung bei transgenen Alzheimer-Mausmodellen mit Anti-A β -Antikörpern kamen ähnliche Dosierungen zum Einsatz. So konnte beispielsweise mit der wöchentlichen intraperitonealen Applikation von 12.5 mg/kg des mE8-Antikörpers bei PDAPP-Mäusen (Demattos et al. 2012) sowie von 200 μg des mAb07/1-Antikörpers bei APP^{swe}/PS1 ΔE9 -Mäusen (Frost et al. 2012) die zerebrale Plaque-Belastung der Mäuse signifikant verringert werden.

4.3 Reduktion des Nervenzellverlustes in der hippocampalen CA1-Region und Verbesserung des Lernverhaltens durch passive Immunisierung mit NT4X bei Tg4-42_{hom}-Mäusen

Der NT4X-Antikörper bindet die N-terminal trunkeierten bzw. modifizierten A β -Varianten A β _{pE3-42} und A β ₄₋₄₂, die einen großen Anteil am Beta-Amyloid im Gehirn von Alzheimer-Patienten ausmachen. Außerdem wirkt er *in vitro* protektiv gegen die Toxizität von oligomere-m A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42} (Antonios et al. 2013; Antonios et al. 2015). Daher eignet er sich ideal für die Verwendung im Tg4-42_{hom}-Mausmodell, bei dem selektiv A β ₄₋₄₂ exprimiert wird (Bouter et al. 2013). Die Charakterisierung des verwendeten NT4X-Antikörpers im Western Blot mit synthetischen Peptiden bestätigte die bereits beschriebene Affinität zu A β ₄₋₄₀, A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42} bei fehlender Bindung an A β _{1-x}-Proteinvarianten (Antonios et al. 2013) und unterstrich damit die Verwendbarkeit dieses Antikörpers für die Immuntherapie.

Die mit NT4X über einen Zeitraum von 12 Wochen passiv immunisierten Mäuse zeigten im Alter von 6 Monaten eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen um 12-13% höhere Nervenzellzahl in der CA1-Region des Hippocampus und damit sogar einen höheren Wert als ihre fünfmonatigen unbehandelten Artgenossen. Außerdem wiesen die immunisierten Tiere im Alter von 6 Monaten im Morris Water Maze ein intaktes räumliches Bezugs-gedächtnis auf, was sich in einer deutlich signifikanten Präferenz des Zielquadranten im *Probe Trial* offenbarte. Während der kompletten Behandlung zeigten sich weder in der anhand der Gewichtsentwicklung bewerteten körperlichen Entwicklung noch hinsichtlich der Motorik signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Mäusen, was eine Beeinflussung der Testergebnisse durch diese Faktoren unwahrscheinlich macht. Daneben fiel erwartungs-gemäß auch die Kontrolle des Arbeitsgedächtnisses im Cross Maze unauffällig aus.

Antikörper gegen verschiedene Isoformen von A β werden hinsichtlich ihres möglichen therapeutischen Potenzials in der Alzheimer-Behandlung intensiv erforscht, seit Solomon et al. mit einem gegen den Amino-Terminus von A β gerichteten Antikörper *in vitro* dessen positive Eigenschaften auf die Bildung und den Abbau von A β -Ablagerungen und damit auf die Neuroprotektion gegen die Toxizität von A β nachgewiesen hatten (Solomon et al. 1996; Solomon et al. 1997). Inzwischen gibt es zahlreiche präklinische Studien über die erfolgreiche passive Immunisierung mit Anti-A β -Antikörpern bei transgenen Alzheimer-Mausmodellen *in vivo*. So konnten beispielsweise die gegen A β_{1-42} gerichteten Antikörper 10D5 und 3D6, von denen der 3D6-Antikörper der murine Vorläufer von Bapineuzumab ist, bei PDAPP-Mäusen die Amyloid-Plaquelastung um 80-86% verringern (Bard et al. 2000). Auch die Immunisierung mit Antikörpern gegen A β_{pE3-42} sorgte mit dem mE8-Antikörper bei PDAPP-Mäusen je nach Hirnregion für eine Amyloid-Reduktion von etwa 30 bis 52% (Demattos et al. 2012) und mit dem 9D5-Antikörper bei 5xFAD-Mäusen für eine signifikant verminderte Amyloid-Plaquelastung im Hippocampus und Kortex sowie für eine Normalisierung der Verhaltensdefizite (Wirhth et al. 2010b).

In den meisten dieser Studien wurde der Erfolg einer Behandlung auf die Reduktion der *Plaque Load*, also der Amyloid-Plaquelastung im Gehirn der getesteten Mäuse bezogen. Dies ist als problematisch zu bewerten, da zerebrale Amyloid-Plaques sehr schlecht mit klinischen Alzheimer-Symptomen korrelieren und bei der Suche nach den zentralen Merkmalen in der Pathogenese des Morbus Alzheimer zunehmend in den Hintergrund treten (Perrin et al. 2009; Benilova et al. 2012). Stattdessen wird diskutiert, ob Amyloid-Plaques eine Art Reservoirfunktion für lösliche A β -Oligomere erfüllen (Haass und Selkoe 2007). Dies wird dadurch unterstützt, dass sich um die Amyloid-Plaques herum ein Hof aus A β -Oligomeren befindet, der mit einem Synapsenverlust von 60% einhergeht (Koffie et al. 2009). Lösliche A β -Oligomere werden derzeit aufgrund dieser und weiterer Erkenntnisse als zentraler Faktor in der Alzheimer-Pathogenese angesehen (Benilova et al. 2012; Bayer und Wirhth 2014), (Absatz 1.4.5). Für die Immuntherapie mit Antikörpern gegen Plaquelastung gebundenes A β wird daher aufgrund einer möglicherweise vermehrten Freisetzung von löslichem A β gar ein erhöhtes Risiko im Sinne einer Verschlechterung des klinischen Verlaufs diskutiert (Bayer und Wirhth 2014). In dieser Arbeit wurde vor diesem Hintergrund als Kriterium für den Erfolg der passiven Immunisierung nicht die Amyloid-Plaquelastung, die bei Tg4-42_{hom}-Mäusen ohnehin nicht zu beobachten ist, sondern die Nervenzellzahl in der CA1-Region des Hippocampus festgelegt, da diese ein morphologisches Korrelat der durch A β induzierten Neurodegeneration bei Alzheimer-Patienten darstellt (West et al. 1994; West et al. 2004).

Insgesamt lässt sich aus den erhobenen Daten folgern, dass die passive Immunisierung mit NT4X bei sechsmonatigen Tg4-42_{hom}-Mäusen die Neurodegeneration in der CA1-Region deutlich abmildert, sodass diese Mäuse im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine um 12-13% höhere Nervenzellzahl aufweisen und die Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis aufgehoben werden. Damit wurde erstmals ein positiver therapeutischer Effekt von passi-

ver Immunisierung mit NT4X in einem Alzheimer-Mausmodell nachgewiesen und $A\beta_{4-42}$ als relevante Zielstruktur in der Alzheimer-Therapie bestätigt.

4.3.1 Wirkungsweise des NT4X-Antikörpers

Obwohl die Wirksamkeit des Einsatzes passiver Immunisierung in Alzheimer-Mausmodellen mehrfach belegt worden ist, bleibt die genaue Wirkungsweise dieser Antikörper-Therapie derzeit noch weitestgehend unklar und damit weiterhin Gegenstand intensiver Forschung (Bayer und Wirths 2014).

So wurde ein katalytischer Effekt zur Auflösung der Amyloid-Aggregate vorgeschlagen, durch den die toxischen $A\beta$ -Ablagerungen wieder in ihre nicht-toxischen Vorgängerpeptide überführt werden (Solomon et al. 1997). Dieser Ansatz erscheint vor dem Hintergrund nicht vorhandener Amyloid-Plaques bei Tg4-42_{hom}-Mäusen sowie deren eingeschränkter Relevanz für die Alzheimer-Pathogenese als Wirkmechanismus von NT4X im Tg4-42_{hom}-Modell als unwahrscheinlich.

Als Alternative wird die Wirkungsweise der Antikörper über eine vermehrte Aktivierung von Mikroglia-Zellen diskutiert (Wang et al. 2011). So könnte der Fc-Teil des gegen $A\beta$ gerichteten Antikörpers von Mikroglia-Zellen erkannt und die Amyloid-Plaques daraufhin durch Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose und den anschließenden Abbau der Peptide abgeräumt werden (Bard et al. 2000). Wilcock et al. (2003) vermuten dabei einen zweiphasigen Abbau des $A\beta$. So zeigte sich nach intrakranieller Injektion von Anti- $A\beta$ -Antikörpern bei transgenen Tg2576-Mäusen im Zeitraum zwischen 4 und 24 Stunden nach der Applikation eine Mikroglia-unabhängige Reduktion der Peptidkonzentration, gefolgt von einer durch Mikroglia-Zellen vermittelten zweiten Phase 1 bis 3 Tage danach (Wilcock et al. 2003). Gegen einen Fc-Rezeptor-vermittelten Abbau des $A\beta$ spricht, dass bei Fc-Rezeptor-Knockout-Mäusen der transgenen Tg2576-Linie die intrazerebrale Amyloid-Konzentration durch passive Immunisierung ähnlich reduziert werden konnte wie bei normalen Tg2576-Mäusen (Das et al. 2003). Darüber hinaus sind die in dieser Arbeit dargestellten positiven Effekte des NT4X-Antikörpers auf den Nervenzellverlust und das Lernverhalten auch bei der Verwendung des Fab-Fragments von NT4X zu beobachten (Antonios et al. 2015). Der Antikörper muss demnach eine Mikroglia-unabhängige Wirkungsweise haben.

Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die *peripheral sink*-Hypothese. Diese besagt, dass der periphere Abbau von $A\beta$ und die damit einhergehende Verschiebung des Konzentrationsgleichgewichts zwischen dem ZNS und der Peripherie zu einer Verminderung des intrazerebralen Amyloids führen. Der periphere Abbau wirkt somit wie bei einem Abfluss fördernd auf das Nachfließen von $A\beta$ aus dem ZNS. So zeigte sich nach dauerhafter Applikation des gegen $A\beta$ -gerichteten Antikörpers m266 bei transgenen PDAPP-Mäusen eine Erhöhung der $A\beta$ -Plasmakonzentration sowie eine Verminderung der Amyloid-Plaques im Gehirn (DeMattos et al. 2001). Nach dieser Hypothese wäre die Wirkung des peripher applizierten Therapeutikums von der Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) unab-

hängig. Demgegenüber fanden Yamada et al. (2009) heraus, dass der m266-Antikörper keine periphere sondern intrazerebrale A β -Monomere bindet und diese möglicherweise neutralisiert, indem er sie vor der Aggregation bewahrt. Auch die vor dem Hintergrund der *peripheral sink*-Hypothese durchgeführte periphere Proteolyse von A β durch die intravenöse Gabe der Amyloid-abbauenden Metalloprotease Neprilysin führte im Gegensatz zur intrazerebralen Anwendung nicht zu einer reduzierten A β -Konzentration im Gehirn von transgenen APP23-Mäusen (Walker et al. 2013). Diese Ergebnisse werden bei peripher eingesetzten BACE1-Inhibitoren zur Hemmung der A β -Produktion durch den auch hier fehlenden Effekt auf die Peptid-Konzentration im Gehirn von Tg2576-Mäusen bestätigt (Georgievska et al. 2015). Aufgrund dieser Erkenntnisse kommt die *peripheral sink*-Hypothese als Erklärung für die positiven Effekte von NT4X bei der passiven Immunisierung von homozygoten Tg4-42-Mäusen eher nicht in Frage.

Ohnehin gilt es als fraglich, inwieweit Verhaltensdefizite überhaupt mit den intrazerebralen Konzentrationen von A β korrelieren. So konnte der m266-Antikörper bei PDAPP-Mäusen Gedächtnisdefizite aufheben, ohne die A β -Konzentration im Gehirn der Mäuse zu verändern (Dodart et al. 2002). Daher ist ein weiterer möglicher Wirkmechanismus der passiven Immunisierung die frühzeitige Bindung des Antikörpers an lösliches oligomeres A β , was die Funktion dieser Peptide als eine Art Keimzentrum für die Aggregation und Ablagerung von weiterem A β und die damit einhergehende Toxizität im Sinne einer Kaskade pathologischer zerebraler Prozesse verhindern könnte (Golde 2003; Demattos et al. 2012). Vor dem Hintergrund, dass lösliche N-terminal trunkierte bzw. modifizierte A β -Oligomere in der Alzheimer-Pathogenese seit einiger Zeit als Hauptursache diskutiert werden, erscheint dies als vielversprechender Erklärungsansatz. So konnte die passive Immunisierung mit einem gegen A β_{pE3-x} gerichteten Antikörper im APP^{swe}/PS1 Δ E9-Mausmodell die Ablagerung von Amyloid-Plaques im Hippocampus und im Kleinhirn signifikant verringern, ohne die mit ELISA ermittelte A β -Konzentration zu verändern (Frost et al. 2012). Tg4-42_{hom}-Mäuse exprimieren selektiv lösliches A β_{4-42} , welches von dem NT4X-Antikörper mit hoher Affinität erkannt und gebunden wird. Dies wirkt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Sinne einer direkten Neutralisierung protektiv gegen die Toxizität von A β_{4-42} (Antonios et al. 2013; Antonios et al. 2015) und resultiert bei Tg4-42_{hom}-Mäusen in einem verminderten Nervenzellverlust und einem verbesserten Lernverhalten. Somit könnte bei rechtzeitiger Intervention ein wichtiger Schritt der Kaskade, die bei Alzheimer-Patienten zu Neurodegeneration und schwerer demenzieller Symptomatik führt, ausgeschaltet werden. Für diesen Erklärungsansatz wäre allerdings die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch NT4X notwendig.

4.3.2 Penetration von NT4X durch die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) erfüllt die physiologische Funktion einer Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS. Sie ist selektiv permeabel und sorgt damit beispielsweise

für eine optimale Homöostase von Nährstoffen, Elektrolyten, Sauerstoff und Stoffwechselprodukten bei gleichzeitigem Schutz vor dem Eindringen von Pathogenen, Entzündungszellen oder hochmolekularen Substanzen wie Antikörpern (Abbott et al. 2010). Dadurch übt die BHS eine immunologische Schutzfunktion für das ZNS aus, limitiert allerdings deutlich die Möglichkeiten medikamentöser Intervention bei neurologischen Erkrankungen. So werden etwa 98-100% der Neurotherapeutika durch die Blut-Hirn-Schranke daran gehindert, an ihren Bestimmungsort im ZNS zu gelangen (Pardridge 2005).

Eine Möglichkeit zur Umgehung der BHS stellt die intraventrikuläre Applikation des Medikaments dar. So konnte gezeigt werden, dass die intraventrikuläre Injektion des NT4X-Antikörpers sowie des NT4X-Fab-Fragments die durch $A\beta_{442}$ induzierten Störungen im Arbeitsgedächtnis von Wildtyp-Mäusen verhindern kann (Antonios et al. 2015). Da dieses Verfahren für die klinische Praxis beim Menschen immense Schwierigkeiten mit sich bringt, ist hier für die passive Immunisierung jedoch eine periphere Applikationsmöglichkeit anzustreben.

Es gibt keinen Zweifel daran, dass peripher applizierte Antikörper trotz der Barrierefunktion der BHS in das ZNS gelangen können. Dieser Anteil wird von Bard et al. (2000) unabhängig von der Isoform des Antikörpers mit 0,1% angegeben. Dies könnte für das Erreichen therapeutisch wirksamer Dosen im ZNS bereits ausreichen. Dennoch wird intensiv nach Möglichkeiten gesucht, um diesen Anteil zu erhöhen und somit die Therapie zu optimieren.

So könnte eine artifiziell induzierte Öffnung der BHS den Arzneimitteldurchtritt erleichtern. Beispielsweise kann die Modulation der für die Verbindung der Endothelzellen untereinander zuständigen *Tight Junctions* einen vermehrten parazellulären Stofftransport ermöglichen (Salama et al. 2006). Auch osmotisch und mit fokussiertem Ultraschall lässt sich die BHS künstlich öffnen (Rapoport 2000; Vykhodtseva et al. 2008). Die erhebliche Größe von Antikörpern wie NT4X stellt jedoch ein großes Problem für den Einsatz dieser Überlegungen bei der passiven Immunisierung dar. Außerdem besteht bei diesen Ansätzen stets die Gefahr, dass die BHS auch ihre physiologische Schutzfunktion gegenüber potenziell ZNS-schädigenden Stoffen verliert und es dadurch zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen kommen könnte.

Des Weiteren könnte gezielt die Penetration der therapeutischen Substanzen durch die BHS über physiologische Transportvorgänge gesteigert werden. Die zentralen Mechanismen für den transendothelialen Transport von größeren Molekülen wie Peptiden und Proteinen durch die BHS sind die adsorptionsvermittelte Transzytose (AMT) und die rezeptorvermittelte Transzytose (RMT) (Abbott 2013). Die genaue Funktionsweise ist noch nicht hinreichend verstanden. Allerdings gibt es Ansätze für die Modifizierung dieser Transportvorgänge, um erhöhte zentralnervöse Arzneimittelkonzentrationen von beispielsweise Antikörpern wie NT4X zu erreichen (Jones und Shusta 2007; Hervé et al. 2008).

Weitere mögliche Zielstrukturen für die Beeinflussung der ZNS-Verfügbarkeit von Arzneimitteln sind der endosomale bzw. lysosomale Abbau von Proteinen sowie das Ubiquitin-Proteasom-System (Ciechanover 2005). Die Umgehung dieser Abbauwege könnte die medikamentöse Therapie neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung deutlich erleichtern (Boer und Gaillard 2007).

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich festhalten, dass der Mechanismus für den Durchtritt von Antikörpern durch die BHS nicht abschließend geklärt ist. Ohne weitere Modifizierung der BHS ist zwar nur ein kleiner Teil des peripher applizierten Antikörpers in der Lage, diese physiologische Barriere zu überwinden, es können jedoch trotzdem therapeutisch wirksame Konzentrationen erreicht werden.

4.3.3 Bewertung von NT4X als mögliches Therapeutikum für die passive Immunisierung von Alzheimer-Patienten in klinischen Studien

Seit längerem ist ein positiver Effekt von aktiver Immunisierung mit A β auf den Nervenzellverlust und Gedächtnisstörungen im Tiermodell bekannt (Schenk et al. 1999; Morgan et al. 2000) und auch für die passive Immunisierung mit gegen verschiedene A β -Varianten gerichteten Antikörpern gibt es vielversprechende Studien in der präklinischen Erprobung (Bard et al. 2000; Wirhth et al. 2010b; Demattos et al. 2012). Die klinischen Studien zur Immuntherapie bei Alzheimer-Patienten fielen allerdings bisher ernüchternd aus. Die Erprobung aktiver Immunisierung mit A β wurde nach gravierenden immunologischen Reaktionen der Patienten eingestellt (Gilman et al. 2005; Spencer und Masliah 2014) und auch bei der passiven Immunisierung blieb der erhoffte Erfolg in der Anwendung beim Menschen bisher weitestgehend aus. Zwar zeigte die Behandlung mit Anti-A β -Antikörpern gegenüber der aktiven Immunisierung mit A β eine bessere Verträglichkeit, jedoch konnten die positiven Ergebnisse aus präklinischen Studien nicht adäquat auf den Menschen übertragen werden.

So hatte Bapineuzumab in zwei Phase-3-Studien keinen signifikanten Effekt auf die Symptome der Patienten. Stattdessen wurde ein erhöhtes Risiko der Patienten für die Entwicklung eines vasogenen Hirnödems festgestellt, woraufhin die klinische Erprobung des Antikörpers eingestellt wurde (Sperling et al. 2011; Salloway et al. 2014). Die Gründe für das Versagen von Bapineuzumab sind nicht abschließend geklärt. Ein Erklärungsansatz wird in den Bindungseigenschaften des Antikörpers gesehen, der sich vor allem gegen in Amyloid-Plaques gehäuft vorkommende A β -Varianten richtet. Amyloid-Plaques erfüllen jedoch, wie bereits erwähnt, möglicherweise eine Reservoirfunktion für toxische lösliche A β -Oligomere, die unter der Antikörpertherapie durch vermehrte Freisetzung zu einer Aggravation der zentralnervösen pathologischen Prozesse beitragen könnten (Haass und Selkoe 2007; Benilova et al. 2012). Der Grund für die hohe Affinität von Bapineuzumab zum N-Terminus von monomerem A β_{1-x} liegt im strukturellen Aufbau der Fab-Region, die das

Erkennen der für die Alzheimer-Pathogenese bedeutsamen N-terminal trunkeierten und modifizierten A β -Varianten durch diesen Antikörper verhindert (Miles et al. 2013).

NT4X hingegen bindet ebenso wie das NT4X-Fab-Fragment an lösliches oligomeres A β und zeigt nur eine geringe Affinität für Amyloid-Plaques (Antonios et al. 2013). In dieser Arbeit wurde die Bindung dieses Antikörpers an A β_{4-40} , A β_{4-42} sowie A β_{pE3-42} bei fehlender Affinität zu A β_{1-x} -Proteinvarianten mittels Western Blot mit synthetischen Peptiden unter reduzierenden Bedingungen herausgestellt. Dies deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Bindungseigenschaften von NT4X auch unter nativen Bedingungen sowie bei der Messung der Assoziations- und Dissoziationskinetik mit biophysikalischen Methoden (Antonios et al. 2013; Antonios et al. 2015). Diese Eigenschaften könnten sich in möglichen klinischen Studien mit NT4X vorteilhaft auswirken, da bevorzugt lösliche N-terminal trunkeierte bzw. modifizierte A β -Varianten erkannt werden. Die moderate Verminderung der *Plaque load* mit einem Schwerpunkt auf A β_{pE3-42} -positive Plaques bei 5xFAD-Mäusen durch NT4X (Antonios et al. 2015) könnte daher zum einen durch die direkte Reduktion der in den Amyloid-Plaques vorhandenen A β_{pE3-42} -Isoformen, zum anderen durch das reduzierte Wirken löslicher N-terminal trunkeierter A β -Oligomere als Keimzentrum für die kaskadenartige Anlagerung von weiterem A β zu erklären sein.

Als weitere Erklärung für den fehlenden Behandlungseffekt von Bapineuzumab wird ein ungeeigneter Zeitpunkt für den Behandlungsbeginn in den klinischen Studien diskutiert, da es bei Alzheimer-Patienten oft bereits Jahrzehnte vor dem Auftreten klinischer Symptomatik zu zerebralen A β -Ablagerungen und Neurodegeneration kommt (Villemagne et al. 2013) und damit eine präventive Behandlung beim Menschen derzeit aufgrund unzureichender Methoden zur Früherkennung nur schwer zu realisieren ist (Crespi et al. 2015). Dieser Erklärungsansatz wird ebenfalls für weitere klinisch getestete Antikörper wie Solanezumab und Crenezumab angeführt. So konnte die Behandlung mit dem eher gegen lösliches A β gerichteten Antikörper Solanezumab bei Alzheimer-Patienten in frühen Stadien die kognitiven und funktionellen Fähigkeiten verbessern, in späteren Stadien jedoch keinen Effekt mehr erzielen (Seubert et al. 2008; Doody et al. 2014; Bouter et al. 2015). In einer laufenden groß angelegten Phase-3-Studie bei Alzheimer-Patienten im leichten Stadium konnte Solanezumab jedoch den Progress der kognitiven Beeinträchtigungen nicht abmildern, während Ergebnisse aus weiteren Studien über einen möglichen präventiven Effekt von Solanezumab bei Patienten im präklinischen Stadium derzeit noch laufen (Fagan und Strobel 2016). Für Crenezumab wurden in Phase-2-Studien vergleichbare Effekte beobachtet wie für Solanezumab (Selkoe und Hardy 2016), eine Erprobung in großangelegten Phase-3-Studien steht allerdings noch aus.

Die in dieser Arbeit gezeigten positiven Ergebnisse der passiven Immunisierung mit NT4X bei Tg4-42_{hom}-Mäusen sind daher zum Teil auf den hier gewählten präventiven Behandlungsansatz zurückzuführen. Es scheint daher bei der Behandlung mit Anti-A β -Antikörpern wichtig zu sein, die Therapie vor dem Auftreten von Amyloid-Ablagerungen und neuronalen Schädigungen zu beginnen, damit die A β -Peptide, besonders lösliche Oligomere aus N-terminal trunkierten Isoformen, durch die Antikörper rechtzeitig neutralisiert werden können. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass der NT4X-Antikörper bei intraventrikulärer Injektion in der Lage ist, die durch neurotoxische Effekte von ebenfalls intraventrikulär appliziertem A β _{4,42} hervorgerufenen Defizite im Arbeitsgedächtnis von Wildtyp-Mäusen im Sinne einer direkten Neutralisierung dosisabhängig zu verringern (Antonios et al. 2015).

Dieser Mechanismus könnte auch eine Erklärung für die sehr vielversprechenden Ergebnisse von Aducanumab in der frühen klinischen Erprobung sein, die derzeit in einer Phase-3-Studie reproduziert werden sollen. Aducanumab ist im Gegensatz zu den humanisierten Antikörpern Bapineuzumab, Solanezumab und Crenezumab ein humaner Antikörper, zeigt eine hohe Affinität sowohl zu Amyloid-Plaques als auch zu A β -Oligomeren und konnte in einer Phase-1b-Studie eine deutliche Amyloid-Reduktion im Gehirn von Patienten bewirken und damit die den kognitiven Verfall nahezu aufhalten (Sevigny et al. 2015; Selkoe und Hardy 2016).

Insgesamt ist festzustellen, dass der NT4X-Antikörper in der präklinischen Erprobung, insbesondere bei der präventiven passiven Immunisierung von Tg4-42_{hom}-Mäusen, sehr positive Ergebnisse erzielen konnte. A β _{4,42} ist als häufige Isoform im Gehirn von Alzheimer-Patienten daher als aussichtsreiche Zielstruktur für die medikamentöse Intervention anzusehen und eine Erprobung von NT4X in klinischen Studien sollte in Betracht gezogen werden.

4.4 Ausblick

Neben den bereits erwähnten Möglichkeiten, eine höhere Konzentration der für die passive Immunisierung verwendeten Antikörper im ZNS zu erreichen, gibt es viele weitere offene Fragen, die für eine effektive Behandlung von Alzheimer-Patienten mit Anti-A β -Antikörpern beantwortet werden müssen.

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Immuntherapie wie auch für die meisten anderen Therapieansätze ist die Früherkennung der Krankheit, da sich bereits abgestorbene Nervenzellen nicht ersetzen lassen. Dennoch ist es zurzeit noch sehr schwierig, die Erkrankung zu diagnostizieren, bevor bestimmte Hirnregionen irreversibel geschädigt sind. Derzeit stellen bildgebende Verfahren wie CT und MRT (Frisoni et al. 2010), die labor-

chemische Untersuchung des Liquor cerebrospinalis auf das Vorhandensein und die Konzentration von $A\beta_{42}$ und Phospho-Tau (Blennow und Zetterberg 2009) sowie neuropsychologische Tests wie der Mini-Mental-Status-Test (Folstein et al. 1975) die wichtigsten diagnostischen Mittel in der klinischen Praxis dar (Absatz 1.2.2). Allerdings dienen diese Verfahren eher der Diagnosesicherung bei Alzheimer-Patienten statt der Früherkennung der Erkrankung. Deshalb werden verschiedene Ansätze diskutiert, um eine rechtzeitige Diagnosestellung zu ermöglichen und die entsprechende Therapie einzuleiten.

So wird der bisher nur in Ausnahmefällen angewendeten Positronenemissionstomographie (PET), besonders der Amyloid-PET mit *Pittsburgh compound B* (PiB), ein großes Potenzial zugeschrieben, da ein reduzierter Metabolismus bestimmter Hirnregionen und frühe Amyloid-Ablagerungen bereits in präklinischen Stadien detektiert werden können (Mosconi et al. 2010). Fibrilläre Amyloid-Ablagerungen sind beispielsweise mittels PiB-Amyloid-PET bereits etwa 15 Jahre vor Symptombeginn detektierbar (Klunk et al. 2004; Bateman et al. 2012).

Daneben könnte die Analyse verschiedener Biomarker im Blut und im Liquor cerebrospinalis eine zukünftige Screening-Methode für den Morbus Alzheimer darstellen. Beispielsweise konnte die Beurteilung der drei Parameter Cortisol, von-Willebrand-Faktor und oxidierte LDL-Antikörper in 81,7% der Fälle zwischen den Blutproben von Alzheimer-Patienten und Kontrollgruppen unterscheiden (Laske et al. 2011). Eine zusammengefasste Beurteilung von 18 verschiedenen Parametern in Blutproben erreichte hier sogar einen Wert von fast 90% und konnte Patienten mit MCI identifizieren, die 2 bis 6 Jahre später an dem Vollbild des Morbus Alzheimer erkrankten (Ray et al. 2007). Im Liquor cerebrospinalis zeigen sich bei FAD-Patienten auffällige Werte für $A\beta_{42}$ bereits 25 Jahre und für das Tau-Protein 15 Jahre vor dem erwarteten Auftreten erster Symptome (Bateman et al. 2012). Dies lässt sich möglicherweise auf Patienten mit der sporadischen Alzheimer-Form übertragen, in deren Gehirn Ablagerungen von $A\beta$ und die damit einhergehende Neurodegeneration der klinischen Symptomatik ebenfalls viele Jahre, möglicherweise sogar Jahrzehnte vorausgehen (Villemagne et al. 2013).

Für den routinemäßigen klinischen Einsatz dieser neuen Methoden ist noch weitere Forschung notwendig. Derzeit laufen jedoch bereits verschiedene Studien für die präventive Behandlung von Menschen mit hohem Alzheimer-Risiko. So wird bei einer kolumbianischen Großfamilie mit der erblichen Anlage der PSEN1 E280A-Mutation eine präventive Studie mit Crenezumab durchgeführt (Ayutyanont et al. 2014; Selkoe und Hardy 2016). Darüber hinaus wird Solanezumab in einem präventiven Behandlungsansatz bei Patienten eingesetzt, die im PET-Screening Amyloid-Ablagerungen aufweisen und somit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung ausgesetzt sind (Sperling et al. 2014). Die Ergebnisse aus diesen Studien werden wichtige Erkenntnisse für die Therapie mit Anti- $A\beta$ -Antikörpern beim Menschen erbringen. Möglicherweise werden die in dieser

Arbeit gezeigten Erfolge eines präventiven Behandlungsansatzes bestätigt und der NT4X-Antikörper ebenfalls für die klinische Erprobung in Betracht gezogen.

Es lässt sich demnach feststellen, dass der passiven Immunisierung bei der Erforschung möglicher Therapieansätze für den Morbus Alzheimer ein großes Potenzial zugeschrieben werden kann. Zwar gab es wie im Falle von Bapineuzumab einige Rückschläge, doch die vielversprechenden Ergebnisse von Aducanumab in klinischen Studien sowie die laufenden präventiven Studien mit Crenezumab und Solanezumab könnten die Alzheimer-Forschung auf der Suche nach einer adäquaten Behandlung deutlich voranbringen. Allerdings sollte für die Therapie von Alzheimer-Patienten aufgrund der Komplexität der Erkrankung ein multimodaler Behandlungsansatz angestrebt werden, der die passive Immunisierung als eine von mehreren verschiedenen Therapieansätzen einschließen könnte.

5 Zusammenfassung

N-trunkiertes $A\beta_{4-42}$ ist eine der häufigsten $A\beta$ -Peptidvarianten im Gehirn von Alzheimer-Patienten und zeigt eine im Vergleich zu anderen Isoformen erhöhte Aggregationsneigung und Toxizität mit konsekutivem Verlust von Nervenzellen. Diese Neurotoxizität und die damit einhergehenden kognitiven Defizite zeigen sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei intraventrikulärer Injektion sowie im für die Expression von $A\beta_{4-42}$ spezifischen Tg4-42-Mausmodell, bei dem besonders die CA1-Region des Hippocampus betroffen ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei homozygoten Tg4-42-Mäusen der Anteil untergegangener Neuronen in dieser Region im Alter von 4 Monaten bereits etwa 17% beträgt, ohne jedoch signifikant zu sein. Fünf- und sechsmonatige Tg4-42_{hom}-Mäuse hingegen weisen mit Werten von 44% bzw. 49% einen hoch signifikanten Nervenzellverlust auf. Diese Neurodegeneration korreliert bei den Mäusen im Alter von 5 Monaten mit einem bereits beeinträchtigten und bei Mäusen im Alter von 6 Monaten mit einem schwer gestörten Lernverhalten, was sich im *Probe Trial* des Morris Water Maze durch die fehlende Präferenz des Zielquadranten ausdrückt. Eine Reduktion der Neuronenzahl in der CA1-Region um etwa 50% scheint bei diesen Tieren folglich eine kritische Grenze für das Funktionieren des räumlichen Bezugsgedächtnisses darzustellen.

Der NT4X-Antikörper richtet sich gegen den Amino-Terminus von oligomerem N-terminal trunkiertem $A\beta_{4-x}$ und $A\beta_{pE3-x}$ bei fehlender Affinität für $A\beta_{1-x}$ -Proteinvarianten. Er vermindert *in vitro* die Toxizität von oligomerem $A\beta_{4-42}$ und neutralisiert bei Wildtyp-Mäusen dessen schädigende Effekte bei intraventrikulärer Applikation ebenfalls *in vivo*. Hier wurden nun Effekte einer präventiven Behandlung mit NT4X bei Tg4-42_{hom}-Mäusen im Hinblick auf Nervenzellverlust und Lernverhalten untersucht. Nach wöchentlicher intraperitonealer Injektion mit NT4X über einen Zeitraum von 12 Wochen zeigten Tg4-42_{hom}-Mäuse im Alter von 6 Monaten eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen um 12-13% höhere Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus und damit sogar einen höheren Wert als ihre unbehandelten fünfmonatigen Artgenossen. Außerdem offenbarten die mit NT4X behandelten Tiere im *Probe Trial* des Morris Water Maze eine signifikante Präferenz des Zielquadranten als Ausdruck eines intakten räumlichen Bezugsgedächtnisses. Die passive Immunisierung mit dem NT4X-Antikörper in einem präventiven Behandlungsansatz scheint demnach in der Lage zu sein, die durch $A\beta_{4-42}$ induzierte Neurodegeneration bei Tg4-42_{hom}-Mäusen zu verzögern und die damit einhergehende kognitive Degeneration aufzuhalten.

Die genaue Wirkungsweise von NT4X ist dabei noch nicht hinreichend erforscht. Als wahrscheinlichste Erklärung für die Effekte des Antikörpers erscheint die Verhinderung der durch β -Amyloid ausgelösten pathologischen Kaskade durch die direkte Neutralisierung von löslichem oligomerem $A\beta$ nach Durchtritt eines kleinen, aber dennoch therapeu-

tisch wirksamen Anteils des peripher applizierten Antikörpers durch die Blut-Hirn-Schranke. Eine therapeutische Modifikation oder Umgehung der BHS könnte in weiteren präklinischen oder klinischen Studien die zentralnervöse Konzentration von NT4X erhöhen und dessen Wirksamkeit möglicherweise verbessern. Außerdem ist vor dem Hintergrund der erfolgreichen präventiven Behandlung mit NT4X bei Tg4-42_{hom}-Mäusen für den möglichen klinischen Einsatz eine bessere Früherkennung der Alzheimer-Krankheit anzustreben, da die Therapie ähnlich wie bei vielen weiteren Behandlungsansätzen in frühen bzw. präklinischen Stadien effektiver zu sein scheint.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die chronische Belastung durch die beim Morbus Alzheimer häufige Peptidvariante A β _{4,42} bei Tg4-42_{hom}-Mäusen zu einer schweren Neurodegeneration und einem stark beeinträchtigten Lernverhalten führt. Dies unterstreicht die toxischen Eigenschaften von intrazellulärem A β _{4,42} und dessen Bedeutung für die Alzheimer-Pathogenese und bestätigt damit die Eignung dieser A β -Isoform als Zielstruktur für die medikamentöse Intervention. Darüber hinaus ist festzustellen, dass der NT4X-Antikörper die Toxizität von A β _{4,42} sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vermindern kann und in der Lage ist, bei präventiver passiver Immunisierung von Tg4-42_{hom}-Mäusen den Nervenzellverlust in der CA1-Region des Hippocampus abzuschwächen sowie Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis aufzuhalten. Der NT4X-Antikörper ist vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse und aufgrund seiner einzigartigen Bindungseigenschaften, die ihn von den bisher in der klinischen Erprobung getesteten und zum Teil erfolglosen A β -Antikörpern unterscheiden, ein vielversprechendes Therapeutikum für klinische Studien und den Einsatz in der Behandlung des Morbus Alzheimer beim Menschen.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott NJ (2013): Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis* 36, 437–449
- Abbott NJ, Patabendige, Adjanie A K, Dolman, Diana E M, Yusof SR, Begley DJ (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13–25
- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I (2009): Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 12, 1567–1576
- Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonietto K, Lohmann S, Piorkowska K, Gafner V, Atwal JK et al. (2012): An effector-reduced anti- β -amyloid (A β) antibody with unique a β binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A β . *J Neurosci* 32, 9677–9689
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL et al. (2000): Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383–421
- Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, Dubois B, Feldman HH, Fox NC, Gamst A, Holtzman DM, Jagust WJ, Petersen RC et al. (2011): The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 270–279
- Alonso A, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001): Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6923–6928
- Alves J, Petrosyan A, Magalhaes R (2014): Olfactory dysfunction in dementia. *World J Clin Cases* 2, 661–667
- Alzheimer A (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr* 64, 146–148
- Alzheimer's Disease International (2015): World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>, Zugriff am 04.08.2016
- Antonios G, Saiepour N, Bouter Y, Richard BC, Paetau A, Verkkoniemi-Ahola A, Lannfelt L, Ingelsson M, Kovacs GG, Pillot T et al. (2013): N-truncated Abeta starting with position four: early intraneuronal accumulation and rescue of toxicity using NT4X-167, a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol Commun* 1, 56

- Antonios G, Borgers H, Richard BC, Brauß A, Meißner J, Weggen S, Pena V, Pillot T, Davies SL, Bakrania P et al. (2015): Alzheimer therapy with an antibody against N-terminal Abeta 4-X and pyroglutamate Abeta 3-X. *Sci Rep* 5, 17338
- Attems J, Jellinger KA, Lintner F (2005): Alzheimer's disease pathology influences severity and topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 110, 222–231
- Ayutyanont N, Langbaum JB, Hendrix SB, Chen K, Fleisher AS, Friesenhahn M, Ward M, Aguirre C, Acosta-Baena N, Madrigal L et al. (2014): The Alzheimer's prevention initiative composite cognitive test score: sample size estimates for the evaluation of preclinical Alzheimer's disease treatments in presenilin 1 E280A mutation carriers. *J Clin Psychiatry* 75, 652–660
- Bailey JA, Maloney B, Ge Y, Lahiri DK (2011): Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid beta-peptide interacting domain (AbetaID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene* 488, 13–22
- Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K et al. (2000): Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916–919
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM et al. (2012): Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 367, 795–804
- Bayer TA, Wirths O (2010): Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2, 8
- Bayer TA, Wirths O (2014): Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 127, 787–801
- Bayer TA, Wirths O, Majtényi K, Hartmann T, Multhaup G, Beyreuther K, Czech C (2001): Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol* 11, 1–11
- Benilova I, Karran E, Strooper B de (2012): The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15, 349–357
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O et al. (2003): Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 184, 247–263
- Blennow K, Zetterberg H (2009): Cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 18, 413–417

- Blennow K, Leon MJ de, Zetterberg H (2006): Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387–403
- Boer AG de, Gaillard PJ (2007): Drug Targeting to the Brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 323–355
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D et al. (1996): Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005–1013
- Bottino CM, Castro CC, Gomes RL, Buchpiguel CA, Marchetti RL, Neto MR (2002): Volumetric MRI measurements can differentiate Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging. *Int Psychogeriatr* 14, 59–72
- Bouter Y: The role of amyloid beta 4-42 in the etiology of Alzheimer's disease. Med. Diss. Göttingen 2014
- Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M et al. (2013): N-truncated amyloid β (A β) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol* 126, 189–205
- Bouter Y, Kacprowski T, Weissmann R, Dietrich K, Borgers H, Brauß A, Sperling C, Wirths O, Albrecht M, Jensen LR et al. (2014): Deciphering the molecular profile of plaques, memory decline and neuron loss in two mouse models for Alzheimer's disease by deep sequencing. *Front Aging Neurosci* 6, 75
- Bouter Y, Lopez Noguerola JS, Tucholla P, Crespi GA, Parker MW, Wiltfang J, Miles LA, Bayer TA (2015): Abeta targets of the biosimilar antibodies of Bapineuzumab, Crenzumab, Solanezumab in comparison to an antibody against N-truncated Abeta in sporadic Alzheimer disease cases and mouse models. *Acta Neuropathol* 130, 713–729
- Braak H, Braak E (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259
- Braak H, Braak E, Ohm T, Bohl J (1989): Alzheimer's disease: mismatch between amyloid plaques and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 103, 24–28
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004): Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14515–14520
- Brouwers N, Sleegers K, van Broeckhoven C (2008): Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann Med* 40, 562–583
- Busch C, Bohl J, Ohm TG (1997): Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging* 18, 401–406
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA (1998): Evidence that tumor necrosis factor alpha converting en-

- zyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273, 27765–27767
- Cacace R, Sleegers K, van Broeckhoven C (2016): Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733–748
- Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993): Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259, 514–516
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998): Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395, 755–756
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F et al. (1999): Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65, 664–670
- Casas C, Sergeant N, Itier J, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk, N, Vingtdoux V, van de Steeg, E, Ret G, Canton T et al. (2004): Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165, 1289–1300
- Castellani RJ, Nunomura A, Lee H, Perry G, Smith MA (2008): Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J Alzheimers Dis* 14, 377–383
- Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB et al. (2000): A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 975–979
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J et al. (2001): Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276, 21562–21570
- Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M (2010): An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med* 12, 1–12
- Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel M, Wirths O, Bayer TA (2008): Transient intraneuronal A beta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol* 116, 647–655
- Ciechanover A (2005): Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79–87
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A et al. (1997): Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase pro-

- duction of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* **3**, 67–72
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005): Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* **8**, 79–84
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **261**, 921–923
- Crespi GA, Hermans SJ, Parker MW, Miles LA (2015): Molecular basis for mid-region amyloid- β capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies. *Sci Rep* **5**, 9649
- Crisby M, Carlson LA, Winblad B (2002): Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **16**, 131–136
- Cullen KM, Halliday GM, Double KL, Brooks WS, Creasey H, Broe GA (1997): Cell loss in the nucleus basalis is related to regional cortical atrophy in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **78**, 641–652
- D'Hooge R, DeDeyn PP (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* **36**, 60–90
- Das P, Murphy MP, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE (2001): Reduced effectiveness of A β 1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition. *Neurobiol Aging* **22**, 721–727
- Das P, Howard V, Loosbrock N, Dickson D, Murphy MP, Golde TE (2003): Amyloid-beta immunization effectively reduces amyloid deposition in FcR γ -/- knock-out mice. *J Neurosci* **23**, 8532–8538
- Deacon RM, Rawlins JN (2006): T-maze alternation in the rodent. *Nat Protoc* **1**, 7–12
- DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001): Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8850–8855
- Demattos RB, Lu J, Tang Y, Racke MM, DeLong CA, Tzaferis JA, Hole JT, Forster BM, McDonnell PC, Liu F et al. (2012): A plaque-specific antibody clears existing β -amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron* **76**, 908–920
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. (2016): S3-Leitlinie Demenzen 2016. www.dgn.org/leitlinien; Zugriff am 05.08.2016

- Dodart J, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, Demattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM et al. (2002): Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.*, 452–457
- Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG et al. (2013): A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 369, 341–350
- Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, Raman R, Sun X, Aisen PS et al. (2014): Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370, 311–321
- Double KL, Halliday GM, Kril JJ, Harasty JA, Cullen K, Brooks WS, Creasey H, Broe GA (1996): Topography of brain atrophy during normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17, 513–521
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D et al. (1996): Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710–713
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier M (2009): Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118, 5–36
- Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A et al. (2008): Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol Dis* 32, 412–419
- Elder GA, Gama Sosa MA, Gasperi R de (2010): Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77, 69–81
- Evans DA, Hebert LE, Beckett LA, Scherr PA, Albert MS, Chown MJ, Pilgrim DM, Taylor JO (1997): Education and other measures of socioeconomic status and risk of incident Alzheimer disease in a defined population of older persons. *Arch Neurol* 54, 1399–1405
- Fagan T, Strobel G (2016): Lilliputian Effect Size Fells Phase 3 Trial of Solanezumab, Leaving Its Future Uncertain. <http://www.alzforum.org/news/research-news/lilliputian-effect-size-fells-phase-3-trial-solanezumab-leaving-its-future>; Zugriff am 29.11.2016
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak-Vance MA, Risch N, van Duijn CM (1997): Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278, 1349–1356
- Fernández-Vizarra P, Fernández AP, Castro-Blanco S, Serrano J, Bentura ML, Martínez-Murillo R, Martínez A, Rodrigo J (2004): Intra- and extracellular Abeta and PHF in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol* 19, 823–844

- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y et al. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117
- 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
- Förstl H, Kurz A (1999): Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249, 288–290
- Frisoni GB, Fox NC, Jack CR, JR, Scheltens P, Thompson PM (2010): The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 67–77
- Frost JL, Liu B, Kleinschmidt M, Schilling S, Demuth H, Lemere CA (2012): Passive immunization against pyroglutamate-3 amyloid- β reduces plaque burden in Alzheimer-like transgenic mice: a pilot study. *Neurodegener Dis* 10, 265–270
- Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP (1996): Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379, 74–78
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F (1995): Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523–527
- Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006): Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 63, 168–174
- Georgievska B, Gustavsson S, Lundkvist J, Neelissen J, Eketjall S, Ramberg V, Bueters T, Agerman K, Jureus A, Svensson S et al. (2015): Revisiting the peripheral sink hypothesis: inhibiting BACE1 activity in the periphery does not alter beta-amyloid levels in the CNS. *J Neurochem* 132, 477–486
- Gilman S, Koller M, Black RS, Jenkins L, Griffith SG, Fox NC, Eisner L, Kirby L, Rovira MB, Forette F et al. (2005): Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64, 1553–1562
- Glenner GG, Wong CW (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885–890
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706
- Golde TE (2003): Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *J Clin Invest* 111, 11–18

- Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996): Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**, 4491–4500
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H et al. (2000): Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* **156**, 15–20
- Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Aisen PS, Bennett DA, Foster NL, Jack CR, JR, Galasko DR, Doody R et al. (2004): Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch Neurol* **61**, 59–66
- Guo Q, Fu W, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP (1999): Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nat Med* **5**, 101–106
- Guyenet SJ, Furrer SA, Damian VM, Baughan TD, La Spada, Albert R, Garden GA (2010): A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J Vis Exp* **39**, <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1787>; Zugriff am 07.07.2016
- Haass C, Selkoe DJ (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101–112
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB (1992): Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322–325
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994): Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* **269**, 17741–17748
- Hacke W: *Neurologie (Springer-Lehrbuch)*, 14. überarbeitete Auflage; Springer, Berlin. Heidelberg 2016
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009): Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* **15**, 112–119
- Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 383–388
- Hartmann T, Bieger SC, Brühl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K et al. (1997): Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* **3**, 1016–1020
- Harvey RJ, Skelton-Robinson M, Rossor MN (2003): The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* **74**, 1206–1209

- Hebert LE, Scherr PA, Beckett LA, Albert MS, Pilgrim DM, Chown MJ, Funkenstein HH, Evans DA (1995): Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *JAMA* 273, 1354–1359
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B (2015): Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 16, 358–372
- Hervé F, Ghinea N, Scherrmann J (2008): CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J* 10, 455–472
- Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011): Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3, 77sr1
- Hotoda N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S (2002): A secreted form of human ADAM9 has an alpha-secretase activity for APP. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 800–805
- 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
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006): AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831–843
- Hu X, Crick SL, Bu G, Frieden C, Pappu RV, Lee J (2009): Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20324–20329
- Hüttenrauch M, Brauß A, Kurdakova A, Borgers H, Klinker F, Liebetanz D, Salinas-Riester G, Wiltfang J, Klafki HW, Wirths O (2016): Physical activity delays hippocampal neurodegeneration and rescues memory deficits in an Alzheimer disease mouse model. *Transl Psychiatry* 6, e800
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT (1997a): APP^{Sw} transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 965–973
- Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT (1997b): Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci* 17, 7053–7059
- 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
- Ittner LM, Götz J (2011): Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12, 65–72

- Iwata N, Higuchi M, Saido TC (2005): Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 108, 129–148
- Iwatsubo T (2004): The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr Opin Neurobiol* 14, 379–383
- Jagust W (2006): Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia. *Alzheimers Dement* 2, 36–42
- Jarmolowicz AI, Chen H, Panegyres PK (2015): The patterns of inheritance in early-onset dementia: Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 30, 299–306
- Jawhar S, Wirths O, Bayer TA (2011): Pyroglutamate amyloid- β (A β): a hatchet man in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286, 38825–38832
- Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2012): Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 196.e29–40
- Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL et al. (2008): ApoE promotes the proteolytic degradation of A β . *Neuron* 58, 681–693
- Jobst KA, Smith AD, Szatmari M, Esiri MM, Jaskowski A, Hindley N, McDonald B, Molyneux AJ (1994): Rapidly progressing atrophy of medial temporal lobe in Alzheimer's disease. *Lancet* 343, 829–830
- Jones AR, Shusta EV (2007): Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res* 24, 1759–1771
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J et al. (2012): A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003): APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736
- Kehoe PG, Wilcock GK (2007): Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *Lancet Neurol* 6, 373–378
- King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ (1999): Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 103, 145–162

- Kishimoto Y, Higashihara E, Fukuta A, Nagao A, Kirino Y (2013): Early impairment in a water-finding test in a longitudinal study of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1491, 117–126
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang G, Estrada S et al. (2004): Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55, 306–319
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM et al. (2009): Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4012–4017
- Krause DL, Müller N (2010): Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010
- Kumar S, Rezaei-Ghaleh N, Terwel D, Thal DR, Richard M, Hoch M, Mc Donald JM, Wüllner U, Glebov K, Heneka MT et al. (2011): Extracellular phosphorylation of the amyloid β -peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J* 30, 2255–2265
- Kumar-Singh S, Theuns J, van Broeck B, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, Dermaut B, Wang R, van Broeckhoven C (2006): Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased A β 42 and decreased A β 40. *Hum Mutat* 27, 686–695
- Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, Walter J, Pape H, König S, Roeber S et al. (2011): Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation. *Neuron* 71, 833–844
- Kuo YM, Webster S, Emmerling MR, De Lima N, Roher AE (1998): Irreversible dimerization/tetramerization and post-translational modifications inhibit proteolytic degradation of A β peptides of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1406, 291–298
- Lalonde R (2002): The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 91–104
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B et al. (2013): Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45, 1452–1458
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999): Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3922–3927

- Laske C, Leyhe T, Stransky E, Hoffmann N, Fallgatter AJ, Dietzsch J (2011): Identification of a blood-based biomarker panel for classification of Alzheimer's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* 14, 1147–1155
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ (1991): A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251, 675–678
- Legleiter J, Czilli DL, Gitter B, Demattos RB, Holtzman DM, Kowalewski T (2004): Effect of different anti-Abeta antibodies on Abeta fibrillogenesis as assessed by atomic force microscopy. *J Mol Biol* 335, 997–1006
- Leitlinie Demenzen 2016: siehe Deutsche Gesellschaft für Neurologie
- Levites Y, Das P, Price RW, Rochette MJ, Kostura LA, McGowan EM, Murphy MP, Golde TE (2006): Anti-Abeta42- and anti-Abeta40-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 116, 193–201
- Lewis H, Beher D, Cookson N, Oakley A, Piggott M, Morris CM, Jaros E, Perry R, Ince P, Kenny RA et al. (2006): Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: age-related accumulation of amyloid-beta(42) peptide in vascular dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32, 103–118
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D (2009): Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 62, 788–801
- Lippa CF, Nee LE, Mori H, St George-Hyslop P (1998): Abeta-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352, 1117–1118
- Lott IT, Head E (2005): Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiol Aging* 26, 383–389
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999): Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155, 853–862
- Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH (2011): Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp* 49, <http://www.jove.com/details.php?id=2376>; Zugriff am 07.07.2016
- Masters CL, Multhaup G, Simms G, Pottgiesser J, Martins RN, Beyreuther K (1985a): Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. *EMBO J* 4, 2757–2763
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985b): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245–4249

- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993): Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243–254
- Mayeux R (2003): Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 26, 81–104
- Mayeux R, Ottman R, Tang MX, Noboa-Bauza L, Marder K, Gurland B, Stern Y (1993): Genetic susceptibility and head injury as risk factors for Alzheimer's disease among community-dwelling elderly persons and their first-degree relatives. *Ann Neurol* 33, 494–501
- McGeer EG, McGeer PL (2010): Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J Alzheimers Dis* 19, 355–361
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, JR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R et al. (2011): The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 263–269
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999): Soluble pool of A β : Amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 46, 860–866
- Medeiros R, LaFerla FM (2013): Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol* 239, 133–138
- Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, Calignon A de, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT (2008): Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451, 720–724
- Miles LA, Crespi GA, Doughty L, Parker MW (2013): Bapineuzumab captures the N-terminus of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide in a helical conformation. *Sci Rep* 3, 1302
- Miller BR, Dorner JL, Shou M, Sari Y, Barton SJ, Sengelaub DR, Kennedy RT, Rebec GV (2008): Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse. *Neuroscience* 153, 329–337
- Miquel J, Blasco M (1978): A simple technique for evaluation of vitality loss in aging mice, by testing their muscular coordination and vigor. *Exp Gerontol* 13, 389–396
- Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC (1995): Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5341–5345

- Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, Duff K, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D et al. (2000): A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982–985
- Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA (2002): Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 9, 88–102
- Mori H, Takio K, Ogawara M, Selkoe DJ (1992): Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267, 17082–17086
- Mori H, Ishii K, Tomiyama T, Furiya Y, Sahara N, Asano S, Endo N, Shirasawa T, Takio K (1994): Racemization: its biological significance on neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med* 174, 251–262
- Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47–60
- Morris RG (1981): Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 12, 239–260
- Mosconi L, Berti V, Glodzik L, Pupi A, Santi S de, Leon MJ de (2010): Pre-clinical detection of Alzheimer's disease using FDG-PET, with or without amyloid imaging. *J Alzheimers Dis* 20, 843–854
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995): Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9697–9701
- Nussbaum JM, Seward ME, Bloom GS (2013): Alzheimer disease: a tale of two prions. *Prion* 7, 14–19
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, van Eldik L et al. (2006): Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26, 10129–10140
- O'Brien JT (1995): Is hippocampal atrophy on magnetic resonance imaging a marker for Alzheimer's disease? *J Geriatr Psychiatry* 10, 431–435
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421
- Pardridge WM (2005): The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3–14
- Paxinos G, Franklin KB: *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 4. Auflage; Academic Press, London 2013

- Pearce JM, Roberts AD, Good M (1998): Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors. *Nature* 396, 75–77
- Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM (2009): Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* 461, 916–922
- Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW (1995): Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270, 23895–23898
- Portelius E, Bogdanovic N, Gustavsson MK, Volkman I, Brinkmalm G, Zetterberg H, Winblad B, Blennow K (2010): Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 120, 185–193
- Postina R (2008): A closer look at alpha-secretase. *Curr Alzheimer Res* 5, 179–186
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC (2001): Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58, 1395–1402
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006): Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212–7221
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O (2008): Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 28, 14537–14545
- Puzzo D, Lee L, Palmeri A, Calabrese G, Arancio O (2014): Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem Pharmacol* 88, 450–467
- Qiu WQ, Folstein MF (2006): Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27, 190–198
- Raber J, Huang Y, Ashford JW (2004): ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol Aging* 25, 641–650
- Rapoport SI (2000): Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol* 20, 217–230
- Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A et al. (2007): Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med* 13, 1359–1362
- Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, Mathis CA, Blennow K, Barakos J, Okello AA et al. (2010): 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol* 9, 363–372

- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T (1994): Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7450–7454
- Russo C, Schettini G, Saido TC, Hulette C, Lippa C, Lannfelt L, Ghetti B, Gambetti P, Tabaton M, Teller JK (2000): Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* 405, 531–532
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S (1995): Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457–466
- Salama NN, Eddington ND, Fasano A (2006): Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 15–28
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Ferris S et al. (2014): Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 370, 322–333
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K et al. (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177
- Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813–831
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schäfer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P et al. (2004): Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 164, 1495–1502
- Selkoe DJ (1994): Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 10, 373–403
- Selkoe DJ (1996): Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271, 18295–18298
- Selkoe DJ, Hardy J (2016): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595–608
- Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Watzet A, David J, Vanmechelen E, Sergheraert C et al. (2003): Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 85, 1581–1591
- Serrano-Pozo A, William CM, Ferrer I, Uro-Coste E, Delisle M, Maurage C, Hock C, Nitsch RM, Masliah E, Growdon JH et al. (2010): Beneficial effect of human anti-amyloid-beta active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain* 133, 1312–1327

- Seubert P, Barbour R, Khan K, Motter R, Tang P, Kholodenko D, Kling K, Schenk D, Johnson-Wood K, Schroeter S et al. (2008): Antibody capture of soluble Abeta does not reduce cortical Abeta amyloidosis in the PDAPP mouse. *Neurodegener Dis* 5, 65–71
- Sevigny J, Chiao P, Williams L, Chen T, Ling Y, O’Gorman J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A (2015): Aducanumab (BIIB037), an anti-amyloid beta monoclonal antibody, in patients with prodromal or mild Alzheimer’s disease: Interim results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1b study. *Alzheimers Dement* 11, 277
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA et al. (2008): Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer’s brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837–842
- Simons M, Keller P, Strooper B de, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998): Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6460–6464
- Skovronsky DM, Doms RW, Lee VM (1998): Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture. *J Cell Biol* 141, 1031–1039
- Smith EE, Greenberg SM (2009): Beta-amyloid, blood vessels, and brain function. *Stroke* 40, 2601–2606
- Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G (2000): Oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 139–144
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK et al. (2005): Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8, 1051–1058
- Solomon B, Koppel R, Hanan E, Katzav T (1996): Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 452–455
- Solomon B, Koppel R, Frankel D, Hanan-Aharon E (1997): Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4109–4112
- Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE et al. (2010): The Alzheimer’s disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE* 5, e9505
- Spencer B, Masliah E (2014): Immunotherapy for Alzheimer’s disease: past, present and future. *Front Aging Neurosci* 6, 114
- Sperling R, Salloway S, Brooks DJ, Tampieri D, Barakos J, Fox NC, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP et al. (2012): Amyloid-related imaging abnormalities in pa-

tients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: A retrospective analysis. *Lancet Neurol* 11, 241–249

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

Sperling RA, Rentz DM, Johnson KA, Karlawish J, Donohue M, Salmon DP, Aisen P (2014): The A4 study: stopping AD before symptoms begin? *Sci Transl Med* 6, 228fs13

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993): Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1977–1981

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA et al. (1997): Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13287–13292

Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994a): An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264, 1336–1340

Suzuki N, Iwatsubo T, Odaka A, Ishibashi Y, Kitada C, Ihara Y (1994b): High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol* 145, 452–460

Tanabe C, Hotoda N, Sasagawa N, Sehara-Fujisawa A, Maruyama K, Ishiura S (2007): ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 111–117

Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC (2008): Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis* 31, 250–260

Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O (2004): Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Ann Neurol* 55, 801–814

Turner RS, Suzuki N, Chyung AS, Younkin SG, Lee VM (1996): Amyloids beta40 and beta42 are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation. *J Biol Chem* 271, 8966–8970

- t'Veld B in, 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
- Vassar R (2002): Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1589–1602
- Vereecken TH, Vogels OJ, Nieuwenhuys R (1994): Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15, 45–54
- Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, Szoëke C, Macaulay SL, Martins R, Maruff P et al. (2013): Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol* 12, 357–367
- Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, Donkelaar HJ ten, Nieuwenhuys R, Schulte BP (1990): Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11, 3–13
- Vorhees CV, Williams MT (2006): Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1, 848–858
- Vykhodtseva N, McDannold N, Hynynen K (2008): Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. *Ultrasonics* 48, 279–296
- Wada H, Nakajoh K, Satoh-Nakagawa T, Suzuki T, Ohru T, Arai H, Sasaki H (2001): Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 47, 271–276
- Wakabayashi T, Strooper B de (2008): Presenilins: members of the gamma-secretase quartets, but part-time soloists too. *Physiology* 23, 194–204
- Walker JR, Pacoma R, Watson J, Ou W, Alves J, Mason DE, Peters EC, Urbina HD, Welzel G, Althage A et al. (2013): Enhanced proteolytic clearance of plasma A β by peripherally administered neprilysin does not result in reduced levels of brain A β in mice. *J Neurosci* 33, 2457–2464
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007): A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172–1184
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002): Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539
- Wang A, Das P, Switzer RC, Golde TE, Jankowsky JL (2011): Robust amyloid clearance in a mouse model of Alzheimer's disease provides novel insights into the mechanism of amyloid-beta immunotherapy. *J Neurosci* 31, 4124–4136
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858–1862

- Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, Golde TE, Younkin SG, Trojanowski JQ, Lee VM (1993): Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9513–9517
- West MJ (2002): Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog Brain Res* 135, 43–51
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991): Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231, 482–497
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994): Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344, 769–772
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004): Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25, 1205–1212
- Whalley LJ, Starr JM, Athawes R, Hunter D, Pattie A, Deary IJ (2000): Childhood mental ability and dementia. *Neurology* 55, 1455–1459
- Wietrzych M, Meziane H, Sutter A, Ghyselinck N, Chapman PF, Chambon P, Krezel W (2005): Working memory deficits in retinoid X receptor gamma-deficient mice. *Learn Mem* 12, 318–326
- Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D (2003): Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci* 23, 3745–3751
- Wild-Bode C, Yamazaki T, Capell A, Leimer U, Steiner H, Ihara Y, Haass C (1997): Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. *J Biol Chem* 272, 16085–16088
- Wilson RS, Barral S, Lee JH, Leurgans SE, Foroud TM, Sweet RA, Graff-Radford N, Bird TD, Mayeux R, Bennett DA (2011): Heritability of different forms of memory in the Late Onset Alzheimer's Disease Family Study. *J Alzheimers Dis* 23, 249–255
- Wirh's O, Bayer TA (2010): Neuron loss in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010, 723782
- Wirh's O, Multhaup G, Bayer TA (2004): A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide—the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91, 513–520
- Wirh's O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth H, Bayer TA (2009): Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118, 487–496

- Wirhth O, Bethge T, Marcello A, Harmeier A, Jawhar S, Lucassen PJ, Multhaup G, Brody DL, Esparza T, Ingelsson M et al. (2010a): Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm* 117, 85–96
- Wirhth O, Erck C, Martens H, Harmeier A, Geumann C, Jawhar S, Kumar S, Multhaup G, Walter J, Ingelsson M et al. (2010b): Identification of Low Molecular Weight Pyroglutamate Abeta Oligomers in Alzheimer Disease: A novel tool for therapy and diagnosis. *J Biol Chem* 285, 41517–41524
- Wittnam J: The contribution of N-terminally modified amyloid beta to the etiology of Alzheimer's disease. Med. Diss. Göttingen 2012
- Wittnam JL, Portelius E, Zetterberg H, Gustavsson MK, Schilling S, Koch B, Demuth H, Blennow K, Wirhth O, Bayer TA (2012): Pyroglutamate amyloid β ($A\beta$) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287, 8154–8162
- Wolfe MS (2008): Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5, 391–398
- Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T (2009): Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta. *J Neurosci* 29, 11393–11398
- Zheng H, Koo EH (2006): The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006): Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9, 268–275
- Zlokovic BV, Deane R, Sallstrom J, Chow N, Miano JM (2005): Neurovascular pathways and Alzheimer amyloid beta-peptide. *Brain Pathol* 15, 78–83
- Zou K, Gong J, Yanagisawa K, Michikawa M (2002): A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* 22, 4833–4841

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Thomas A. Bayer bedanken, der mir ein spannendes und vielseitiges Thema zur Verfügung gestellt hat und mir jederzeit mit klugen Ratschlägen, Optimismus und großer Hilfsbereitschaft zur Seite stand.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Yvonne Bouter für bemerkenswerte Geduld und großes Engagement bei meiner Einarbeitung im Labor sowie für fachliche Kompetenz und ausgesprochene Herzlichkeit.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für molekulare Psychiatrie danke ich für die kollegiale Atmosphäre und die freundliche Aufnahme im Labor, insbesondere Dr. Oliver Wirths für gute Ideen und Denkanstöße, Gregory Antonios für die Bereitstellung des Antikörpers sowie Petra Tucholla für Hilfsbereitschaft und Logistik.

Ich danke Andreas Brauß für Anregungen, Teamwork und die humorvolle Gesellschaft an langen Labortagen.