

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

Studie zur Rolle N-trunkierter Amyloid- β -Peptide bei der Alzheimer-Krankheit

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Nicolai Maurice-Etienne Gießen

aus

Pirmasens

Göttingen 2019

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

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. T. A. Bayer

Ko-Betreuer: Prof. Dr. H. Jarry

Prüfungskommission

Referent/in:

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Studie zur Rolle N-trunkierter Amyloid- β -Peptide bei der Alzheimer-Krankheit" 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:

Lopez-Noguerola JS, **Giessen NME**, Ueberück M, Meißner JN, Pelgrim C, Adams J, Wirths O, Bouter Y, Bayer TA (2018): Synergistic effect on neurodegeneration by N-truncated A β 4-42 and pyroglutamate A β 3-42 in a mouse model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 10, 64

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Alzheimer-Krankheit	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.2.1 Genetik als Risikofaktor.....	2
1.1.3 Klinischer Verlauf.....	3
1.1.4 Diagnostik.....	4
1.1.5 Therapie	5
1.2 Neuropathologische Kennzeichen.....	6
1.2.1 Amyloid-Ablagerungen.....	6
1.2.2 Neurofibrillenbündel.....	6
1.2.3 Hirnatrophie und Neuronenverlust.....	7
1.2.4 Entzündung.....	7
1.3 Vom Amyloid-Vorläuferprotein (APP) zu toxischen Aβ-Peptiden.....	8
1.3.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein	8
1.3.2 APP-Prozessierung.....	9
1.3.2.1 Nicht-amyloidogener Weg.....	9
1.3.2.2 Amyloidogener Weg	9
1.3.3 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	11
1.3.4 Amyloid- β -Varianten	13
1.3.4.1 Amyloid- β_{4+42} und Amyloid- β_{pE3-42}	14
1.3.4.2 Aggregation und Toxizität	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits	18
2.1.2 Elektronische Geräte	20
2.1.3 Sonstige Utensilien und Produkte.....	21
2.1.3 Antikörper	22
2.2 Tiere.....	23
2.2.1 Haltungsverbedingungen	23
2.2.2 Transgene Mauslinien	23
2.2.2.1 Tg4-42-Mauslinie.....	23
2.2.2.2 TBA42-Mauslinie	23
2.2.2.3 Bigene Mauslinie.....	24
2.2.3 Vorbereitung der Hirnproben durch autorisiertes Personal.....	24

2.2.3.1	Immunisierung mit dem Antikörper NT4X	24
2.2.3.2	Der Antikörper NT4X	25
2.3	Methoden.....	26
2.3.1	Identifikation der Mauslinien.....	26
2.3.1.1	DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien:	26
2.3.1.2	Messen der DNA-Konzentration	26
2.3.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.3.1.4	DNA-Agarosegel-Elektrophorese	27
2.3.2	Anfertigung der Hirnschnitte	28
2.3.2.1	Anfertigung der Hirnschnitte am Kryostat	28
2.3.2.2	Anfertigung der Hirnschnitte am Mikrotom.....	28
2.3.3	Immunhistochemie	28
2.3.3.1	3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung.....	28
2.3.3.2	Immunhistochemische Fluoreszenz-Färbung	29
2.3.3.3	Immunhistochemie nach der Free-Floating-Methode	30
2.3.4	Kresylviolett-Färbung und Quantifizierung der Neuronenzahl.....	31
2.3.4.1	Kresylviolett-Färbung.....	31
2.3.4.2	Design-basierte Stereologie.....	32
2.3.5	Quantifizierung der Mikrogliaaktivität in DAB-gefärbten Präparaten.....	35
2.3.6	Statistik	37
2.3.7	Software	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Bestätigung der verwendeten Mausmodelle.....	38
3.1.1	Unterscheidung der Transgene vom Wildtyp mittels Gelelektrophorese.....	38
3.1.2	Darstellung der verschiedenen A β -Peptide zur Bestätigung der verwendeten Mausmodelle	39
3.2	Amyloid-beta-Expression im Tg4-42-Mausmodell	41
3.2.1	A β -Expression in der CA1-Region des Hippocampus, Striatum und piriformer Kortex	41
3.3	Neuronenverlust im Tg4-42-Mausmodell.....	42
3.3.1	Signifikanter Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei 6 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Mäusen	42
3.3.2	Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal Striatum bei 6 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Mäusen	43
3.3.3	Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal piriformer Kortex bei 6 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Mäusen	44
3.4	Signifikante Verbesserung der Mikrogliose durch passive Immunisierung mit dem Antikörper NT4X im Bereich des Kortex bei Tg4-42_{hom}-Mäusen.....	44
3.5	Die Kombination der Aβ-Varianten Aβ₄₋₄₂ und Aβ_{pE3-42} verstärkt den Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus	46
3.5.1	Hochsignifikanter Nervenzellverlust bei Bigenen gegenüber allen Gruppen im Alter von 3 Monaten.....	46
3.5.2	Hochsignifikanter Nervenzellverlust bei Bigenen im Alter von 6 Monaten.....	47

3.5.3	Alters- und Genotyp abhängige Effekte durch die Kombination von $A\beta_{4-42}$ und $A\beta_{pE3-42}$	49
4	Diskussion	51
4.1	Der Einfluss von N-trunkiertem $A\beta_{4-42}$ auf die Neuronenzahl der CA1-Region des Hippocampus, Striatum und piriformer Kortex im Tg4-42-Mausmodell	51
4.1.1	N-trunkiertes $A\beta_{4-42}$ führt zu einem signifikanten Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei 6 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Mäusen	51
4.1.2	N-trunkiertes $A\beta_{4-42}$ hat keinen Einfluss auf die Neuronenzahl im Hirnareal Striatum bei 6 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Mäusen.....	54
4.1.3	N-trunkiertes $A\beta_{4-42}$ hat keinen Einfluss auf die Neuronenzahl im Hirnareal piriformer Kortex bei 6 Monate alten Tg4-42-Mäusen	56
4.2	Mikrogliose im Tg4-42-Mausmodell	57
4.2.1	N-trunkiertes $A\beta_{4-42}$ führt zu Mikrogliose im Kortex-Areal bei 6 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Mäusen	57
4.2.2	Die passive Immunisierung mit dem Antikörper NT4X führt zu einer signifikanten Verbesserung der Mikrogliose im Kortex-Areal bei 6 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Mäusen	58
4.3	Der Einfluss von N-trunkiertem $A\beta_{4-42}$ und $A\beta_{pE3-42}$ auf die Neuronenzahl der CA1-Region des Hippocampus in einem neuartigen transgenen Mausmodell...	60
5	Ausblick	63
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: APP-Prozessierung.....	11
Abbildung 2: Schema zur β -Amyloid-Kaskade (grau) und der modifizierten β -Amyloid-Kaskade (blau).....	13
Abbildung 3: Immunisierungsprotokoll	25
Abbildung 4: Grundprinzip und Regeln der Stereologie.....	33
Abbildung 5: Übersicht Hirnregionen	35
Abbildung 6: Schema der Auswertung des Kortex-Areal	36
Abbildung 7: Exemplarische Gelelektrophorese.....	38
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbungen zu den in der Arbeit verwendeten Mausmodellen.....	40
Abbildung 9: Koronarschnitte einer rechten Großhirnhemisphäre einer 2 Monate alten Tg4-42 _{hom} -Maus	41
Abbildung 10: A β -Expression im Tg4-42-Mausmodell.....	42
Abbildung 11: Neuronenverlust und Volumenabnahme in Tg4-42 _{hom} -Mäusen	43
Abbildung 12: Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal Striatum.....	43
Abbildung 13: Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal piriformer Kortex.....	44
Abbildung 14: Behandlungseffekt durch passive Immunisierung mit NT4X	45
Abbildung 15: Effekt von A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42} im Bigen-Mausmodell auf die Neuronenzahl und das Volumen in der CA1-Region des Hippocampus zum Zeitpunkt von 3 Monaten.....	47
Abbildung 16: Effekt von A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42} im Bigen-Mausmodell auf die Neuronenzahl und das Volumen in der CA1 Region des Hippocampus zum Zeitpunkt von 6 Monaten.....	48
Abbildung 17: Alters- und Genotyp-abhängiger Effekt durch die Ko-Expression von A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42}	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Kits	18
Tabelle 2: Geräteliste.....	20
Tabelle 3: Sonstige Utensilien und Produkte.....	21
Tabelle 4: Primäre Antikörper	22
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper.....	22
Tabelle 6: PCR-Zyklen-Protokoll des LabCycler für Nukleinsäure-Amplifikation.....	27
Tabelle 7: Legende und allgemeine Formeln zur Berechnung der Neuronenzahl	34
Tabelle 8: Parameter zur Stereologie der analysierten Hirnregionen.....	34
Tabelle 9: Software	37
Tabelle 10: Spezifische Verteilungsmuster der A β -Varianten in den untersuchten Mausmodellen	39

Abkürzungsverzeichnis

A β	beta-Amyloid
A β_{4-x}	N-terminal trunkiertes A β , das mit Phenylalanin an Position 4 beginnt
A β_{pE3-x}	N-terminal trunkiertes A β , das mit Pyroglutamat an Position 3 beginnt
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i>
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid precursor protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
BACE	<i>β-site APP-cleaving enzyme</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CAA	<i>cerebral amyloid angiopathy</i> (zerebrale Amyloidangiopathie)
CT	Computertomographie
CTF	<i>C-terminal fragment</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalographie
EtOH	Ethanol
FAD	<i>familial alzheimer's disease</i> (Familiäre Alzheimer-Krankheit)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
IgG	Immunglobulin G
MCI	<i>mild cognitive impairment</i>
MMST	Mini-Mental-Status-Test
MRT	Magnetresonanztomographie
N-Terminus	Amino-Terminus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAR	nicht steroidale Antirheumatika
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)
PSEN	Präsenilin
QC	<i>glutaminyl cyclase</i>

sAPP α	<i>secreted amyloid precursor protein α</i>
sAPP β	<i>secreted amyloid-precursor protein β</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TBA42 _{hem}	Mäuse der TBA42-Mauslinie mit Hemizygotie für das Transgen
TBA42 _{hom}	Mäuse der TBA42-Mauslinie mit Homozygotie für das Transgen
Tg4-42 _{hem}	Mäuse der Tg4-42-Mauslinie mit Hemizygotie für das Transgen
Tg4-42 _{hom}	Mäuse der Tg4-42-Mauslinie mit Homozygotie für das Transgen
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Alzheimer-Krankheit

Die Demenz vom Alzheimer-Typ oder auch Alzheimer-Krankheit (engl. *Alzheimer's Disease, AD*) genannt, ist neben der Lewy-Körper-Krankheit, der vaskulären Demenz und der frontotemporalen Demenz die klinisch häufigste Form der Demenzerkrankungen des alten Menschen (Barker et al. 2002). Leitsymptome sind u. a. Gedächtnis- und Orientierungsstörungen sowie Einschränkungen in praktischen Fähigkeiten (Alzheimer's Disease International 2017).

Erstmals durch den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer im Jahre 1907 beschrieben und seither Gegenstand der modernen Forschung, ist die Alzheimer-Krankheit noch immer nicht vollends verstanden. Heutige Therapieansätze beschränken sich ausschließlich auf eine symptomatische Therapie und können den (schweren) Krankheitsverlauf allenfalls mildern, aber keineswegs aufhalten oder gar heilen. Fokus der aktuellen Forschung ist unter anderem die Rolle von Amyloid-Beta-Peptiden ($A\beta$), deren Verteilungsmustern im Gehirn und Zusammenspiel im Hinblick auf die Pathogenese und die damit verbundenen Therapiemöglichkeiten.

1.1.1 Epidemiologie

46,8 Millionen Menschen leben laut Angabe des World-Alzheimer-Report von 2015 mit einer Demenzerkrankung. Die Zahl der Erkrankten wird sich alle 20 Jahre verdoppeln, bis schließlich 2050 schätzungsweise 131,5 Millionen Menschen betroffen sind (Alzheimer's Disease International 2015).

In Deutschland leben zurzeit etwa 1,6 Millionen Demenzerkrankte, davon circa 60% mit Morbus Alzheimer. Bei einer mittleren Neuerkrankungswahrscheinlichkeit (Inzidenzrate) von etwa 1,95% ab einem Alter von 65 Jahren und älter – senile Form der Alzheimer-Krankheit (engl. *late-onset Alzheimer's Disease, LOAD*) - beträgt die geschätzte Zahl der Neuerkrankenden etwa 300.000. Damit steigen die Fallzahlen bis 2030 auf etwa 3 Millionen an (Alzheimer's Disease International 2015; Cacace et al. 2016; Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. 2016). Hingegen liegt die Zahl der an Demenz erkrankten vor dem 65. Lebensjahr – präsenile Form (engl. *early-onset Alzheimer's Disease, EOAD*) - bei etwa 10% (Cacace et al. 2016).

Insgesamt erkranken mit etwa 70% deutlich mehr Frauen als Männer (ca. 30%) an einer Demenz, was auf die durchschnittlich höhere Lebenserwartung bei Frauen zurückzuführen ist (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. 2016).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Bei der Ätiologie der Alzheimer-Krankheit ist, abgesehen von einem kleinen Teil der Krankheitsfälle mit familiär gehäuften Vorkommen und eindeutiger genetischer Ursache (Absatz 1.1.2.1), ein heterogenes Zusammenspiel aus Umweltfaktoren und genetischer Disposition für die Entstehung der sporadischen senilen Verlaufsform wahrscheinlich (Mayeux und Stern 2012). Der mit Abstand bedeutendste und gleichzeitig nicht beeinflussbare Risikofaktor ist das Alter. Die Inzidenz steigt dabei mit dem Alter exponentiell an und verdoppelt sich laut World-Alzheimer-Report von 2015 alle 6,3 Jahre von 3,9/1000 Personen im Alter zwischen 60-64 zu 104,8/1000 Personen im Alter von 90 Jahren und älter (Alzheimer's Disease International 2015; Blennow et al. 2006). Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, chronischer Alkoholkonsum und Rauchen fördern das Risiko für eine dementielle Erkrankung. Ebenso arteriosklerotische Veränderungen der hirnversorgenden Gefäße mit der Folge einer chronisch-zerebralen Minderperfusion tragen zur Entstehung verschiedener neurodegenerativen Erkrankungen bei, so auch der Alzheimer-Krankheit (de Oliveira et al. 2014; Duncombe et al. 2017; Kivipelto et al. 2001; Toledo et al. 2013; Li et al. 2011). Des Weiteren besteht bei Individuen mit Trisomie 21 eine fast 90%ige Wahrscheinlichkeit, an Alzheimer zu erkranken (Colacurcio et al. 2017; Zis und Strydom 2017). Der Einfluss von Schädel-Hirn-Traumata auf die Entstehung von Alzheimer wurde zuletzt kontrovers diskutiert, wobei es auch hier in der Vergangenheit Anhaltspunkte für eine Mitbeteiligung gab (Tolppanen et al. 2017; Weiner et al. 2017).

1.1.2.1 Genetik als Risikofaktor

Neben der senilen Form der Alzheimer-Krankheit, die den überwiegenden Teil der Erkrankungsfälle ausmacht, liegen bei etwa 10% der erkrankten Patienten genetische Ursachen zu Grunde, von diesen wiederum etwa 10-15% autosomal-dominant vererbt werden (engl. *Familial Alzheimer's Disease, FAD*) (Jarmolowicz et al. 2015). So wurden drei Gene identifiziert, deren Mutationen besonders mit der Erkrankung vergesellschaftet sind. Dazu gehören das APP-Gen, das für das Amyloid-Vorläuferprotein kodiert, sowie die beiden Gene PSEN1 und PSEN2 (Cacace et al. 2016).

Das APP-Gen, lokalisiert auf Chromosom 21, war das erste Gen, in welchem Mutationen in der kodierenden Sequenz im Zusammenhang mit der FAD zu beobachten waren (Holtzman et al. 2011). Meist sind es heterozygote Missens-Mutationen nahe der Amyloid- β -kodierenden Exone 16 und 17 (Goate et al. 1991). Darüber hinaus sind Duplikationen des gesamten Gens (Rovelet-Lecrux et al. 2006) sowie seltenere rezessive kleinere Deletionen (Rogaev et al. 1995) bekannt. Diese münden entweder in einer gesteigerten Amyloidproduktion, Veränderungen im Verhältnis von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{40}$ oder erhöhter $A\beta$ -Fibrillenbildung (Bettens et al. 2013).

Das PSEN1-Gen ist mit 215 Mutationen das am häufigsten mutierte Gen im Zusammenhang mit der familiären Alzheimer-Krankheit, wohingegen für PSEN2 31 Mutationen identifiziert werden konnten (Cacace et al. 2016). Sie kodieren für die Präseniline, die das katalytische Zentrum der γ -Secretase beinhalten, welche am Abbau verschiedener Typ-I-Transmembranproteine, so auch des Amyloid-Vorläuferproteins, beteiligt sind (Absatz 1.3) (Bentahir et al. 2006). Sie beeinträchtigen den γ -Secretase-vermittelten Abbau von APP, woraus unter anderem ein erhöhtes Verhältnis von $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{40}$ resultiert (Bettens et al. 2013).

Obwohl Mutationen in den oben genannten Genen APP, PSEN1 und PSEN2 ein deutlich erhöhtes Risiko für frühe Formen der Alzheimer-Krankheit darstellen, so sind für die sporadische Form keine Mutationen bekannt. Als bedeutender Risikofaktor konnte allerdings das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoprotein-E-Gens (ApoE) in einer genomweiten Kopplungsstudie in Familien mit seniler Form des M. Alzheimer identifiziert werden (Pericak-Vance et al. 1991). Von dem auf Chromosom 19 liegenden ApoE-Gen sind insgesamt drei Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$) bekannt. Sie kodieren für das multifunktionale Transportprotein Apolipoprotein E, dessen Hauptaufgabe im Transport von Cholesterin besteht und damit eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt (Xiao et al. 2017). Das Vorhandensein von einer oder gar beider Kopien des ApoE $\epsilon 4$ -Allels erhöht dabei beispielsweise das Risiko an einer senilen Form der Alzheimer-Krankheit zu erkranken um den Faktor 3 bis hin zum 15-Fachen in dosisabhängiger Weise (Corder et al. 1993; Farrer et al. 1997; Cacace et al. 2016).

1.1.3 Klinischer Verlauf

Die Alzheimer Demenz ist durch einen chronisch progredienten Verlauf gekennzeichnet. Die Beeinträchtigung des Einzelnen kann gerade in den frühen Stadien sehr unterschiedlich geprägt sein und bedarf daher einer genauen Beschreibung und Einordnung der Symptome in die jeweilige Krankheitsphase. Das *National Institute on Aging* und die *Alzheimer's Association* überarbeiteten dazu im Jahre 2011 die erstmals 1984 beschriebenen Kriterien zur Alzheimer-Demenz (McKhann et al. 1984) und erstellten Empfehlungen und Handlungsanweisungen zur Einteilung und Diagnose der Alzheimer-Krankheit (McKhann et al. 2011). Der Krankheitsprozess kann in drei Stadien eingeteilt werden. Das „präklinische Stadium“ (engl. *preclinical AD*), welches bereits viele Jahre vor der klinischen Diagnose „Alzheimer-Demenz“ einzuordnen ist, beschreibt eine Phase, in der noch keine das alltägliche Leben beeinträchtigenden Symptome erkennbar sind, jedoch bereits histopathologische und Biomarker-positive Befunde gestellt werden können (Sperling et al. 2011). Dieses „präklinische Stadium“ kann, muss aber nicht zwangsläufig einen Progress in das Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung (engl. *mild cognitive impairment, MCI*) haben. Im Stadium des *MCI* sind bereits syndromale Auffälligkeiten im Sinne klinischer und kognitiver Veränderungen zu finden. Zu den Kernkriterien des *MCI* zählen unter

anderem eine verminderte Leistung von Gedächtnis, exekutiven Funktionen, Aufmerksamkeit, Sprache und räumlicher Wahrnehmung. Dadurch werden alltägliche Handlungsabläufe beeinträchtigt, jedoch können die Betroffenen ihr Leben, wenn auch teilweise mit kleineren Hilfestellungen durch Dritte, selbstständig organisieren und bewältigen (Albert et al. 2011). Auch dem Stadium des *MCI* folgt nicht zwangsläufig eine Demenz vom Alzheimer-Typ, jedoch gehen etwa 10-15% der Fälle in eine Alzheimer Demenz über (Grundman et al. 2004; Alzheimer's Association 2018b). Im letzten Stadium, der eigentlichen Demenz vom Alzheimer-Typ, verlieren die Patienten je nach Schwere die Fähigkeit, mit ihrer Umwelt zu interagieren. Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch den Verlust der Gedächtnisfunktionen, insbesondere den Verlust von kürzlich erlernter Information und Erkennen von Gesichtern, Einschränkung im Verstehen und Durchführen komplexer Aufgaben, Verlust des Urteilsvermögens und räumlich-visueller Funktionen, den Verlust von Sprache und die Veränderung/ Verlust der individuellen Persönlichkeit (McKhann et al. 2011). Da bis dato keine kausale Therapie der Alzheimer Demenz existiert, werden die Betroffenen im Verlauf der Krankheit weitestgehend bettlägerig und pflegebedürftig. Daraus resultierend ist das Risiko, an einer Infektion, insbesondere an einer Pneumonie zu erkranken und daran zu versterben, deutlich erhöht (Förstl und Kurz 1999; Wada et al. 2001).

1.1.4 Diagnostik

Die Diagnose „Alzheimer“ kann nicht mittels eines einzigen Tests gestellt werden. Vielmehr bedarf es bei Individuen, die erste Anzeichen einer kognitiven Funktionsstörung zeigen, einer tiefgründigen anamnestischen und klinischen Evaluation der Symptome. Ein vielschichtiges Konzept, bestehend aus neuropsychologischen Tests, laborchemischen Biomarkern und bildgebenden Verfahren, findet dabei Verwendung (Alzheimer's Association 2018a). Nach der aktuellen S3-Leitlinie „Demenzen“ (Leitlinie Demenzen 2016) erfolgt im ersten Schritt des Algorithmus bei der Beurteilung von kognitiven Leistungseinschränkungen oder Persönlichkeitsveränderungen eine ausführliche Eigen- und Fremdanamnese sowie die Erhebung eines psychopathologischen Befunds und eine erste Einschätzung der kognitiven Funktion mittels *Mini Mental State Test (MMST)*. Der MMST besteht aus 9 Aufgabenfeldern und erfasst die Leistungen im Bereich Denk- und Merkfähigkeit, zeitliche und räumliche Orientierung sowie weitere kognitive Funktionen (Folstein et al. 1975). Mithilfe des Tests kann darüber hinaus anhand der erreichten Punktzahl eine Schweregradeinteilung der Demenz erfolgen. So können im ersten Schritt bereits Hinweise für und gegen das Vorliegen einer möglichen Alzheimer-Krankheit selektiert werden (bspw. Delir, Symptome bei Medikamenteneinnahme, Depression). Erhärtet sich der Verdacht auf ein dementielles Syndrom oder ist der Verdacht unklar, erfolgt im nächsten Schritt eine spezifische ätiologische Abklärung. Diese erfolgt unter anderem neben der standardisierten Blutlabordiagnostik mithilfe der Liquordiagnostik. Ein charakteristischer Liquorbefund liegt vor bei Erhöhung von (phosphoryliertem) Tau-

Protein und Verminderung von $A\beta_{42}$ (McKhann et al. 2011). Zur differentialdiagnostischen Beurteilung sollen die Befunde durch bildgebende Verfahren mittels cranio-Computertomographie (cCT) und/oder cranio-Magnetresonanztomographie (cMRT) ergänzt werden. Charakteristische strukturelle Veränderungen sind dabei eine generalisierte Hirnatrophie und Atrophie des medialen Temporallappens im Bereich des Hippocampus und Gyrus parahippocampalis (Zakzanis et al. 2003). Ebenfalls Anwendung in der weiterführenden Diagnostik finden nuklearmedizinische Verfahren (Positronen-emissionstomographie (PET) zur Messung des Glukosemetabolismus und die Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) zur Messung der zerebralen Durchblutung), genetische Beratung und Elektroenzephalographie (EEG). In der aktuellen S3-Leitlinie wird die Anwendung dieser Verfahren allerdings nur in unklaren Fällen empfohlen (Leitlinie Demenzen 2016).

1.1.5 Therapie

Eine kausale Therapie zur Heilung der Alzheimer-Demenz existiert bislang nicht. Eine pharmakologische Therapie dient in erster Linie der Behandlung von Begleitsymptomen und zielt allenfalls auf Verzögerung des Krankheitsprozesses ab. Nach der aktuellen S3-Leitlinie „Demenzen“ (Leitlinie Demenzen 2016) richten sich die Therapiemöglichkeiten nach dem klinischen Schweregrad der Erkrankung und beinhalten neben psychosozialen Interventionen und kognitiven Verfahren, Strategien zur Bewältigung des Alltags und der medikamentösen Therapie. Die medikamentöse Therapie dient hauptsächlich der Verbesserung kognitiver Funktionen und der besseren Verrichtung alltäglicher Aktivitäten. Dabei spielen Acetylcholinesterase-Hemmer und nicht-kompetitive NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor-Antagonisten die größte Rolle. Zu den Acetylcholinesterase-Inhibitoren zählen unter anderem Donepezil, Galantamin und Rivastigmin und werden bei der milden und moderaten Form der Erkrankung empfohlen. Durch den verringerten Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin wird die neuronale Erregbarkeit an cholinergen Neuronen gesteigert, was zur temporären Stabilisierung kognitiver Leistungen führt. Der nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin hingegen wird bei moderaten bis schweren Krankheitsverläufen als Monotherapie oder Add-on-Behandlung zusammen mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren eingesetzt.

Eine untergeordnete Rolle in der medikamentösen Therapie der Alzheimer-Demenz nehmen Ginkgo Biloba, Vitamin E und nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) ein, deren Wirksamkeit nur unzureichend durch Studien belegt ist.

Weitere therapeutische Maßnahmen richten sich nach Begleitsymptomen wie beispielsweise Angst, Depression, Wahn und Hyperaktivität (Leitlinie Demenzen 2016).

1.2 Neuropathologische Kennzeichen

1.2.1 Amyloid-Ablagerungen

Eines der zentralen histopathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit sind die aus Amyloid-beta ($A\beta$) bestehenden Ablagerungen im Hirnparenchym. Aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (engl. *amyloid precursor protein*, APP) enzymatisch abgespaltene $A\beta$ -Peptide lagern sich im extrazellulären Raum zu unlöslichen Aggregaten zusammen (Golde et al. 2000; Matsui et al. 2007). Anhand ihres Erscheinungsbildes und ihrer Möglichkeit der Anfärbbarkeit mit immunhistochemischen Methoden können Amyloid-Ablagerungen wie folgt voneinander abgegrenzt werden: Diffuse Plaques und Plaques mit neuritischer Korona. Diffuse $A\beta$ -Ablagerungen sind kaum immunreaktiv und konnten auch in großer Zahl bei als klinisch „unauffällig“ gewerteten Individuen gefunden und somit als nicht zwingend toxisch eingestuft werden (Delaère et al. 1990; Duyckaerts et al. 2009; Holtzman et al. 2011). Plaques mit neuritischer Korona hingegen sind gekennzeichnet durch einen stets vorhanden Amyloid-Kern, hauptsächlich bestehend aus $A\beta_{42}$ und $A\beta_{40}$ (Güntert et al. 2006). In direkter Umgebung, um den Amyloid-Kern angeordnet, sind neuritische und astrozytäre Komponenten sowie Tau-Proteine und APP zu finden. Deshalb werden diese auch als die eigentlichen neuritischen Plaques oder auch senile Plaques bezeichnet (Duyckaerts et al. 2009). Darüber hinaus konnten in vielen Alzheimer-Fällen $A\beta$ -Ablagerungen auch in Wänden von Blutgefäßen im Gehirn gefunden werden. Diese als zerebrovaskuläre Plaques oder zerebrale Amyloidangiopathie (engl. *cerebral amyloid angiopathy*, CAA) bezeichneten alzheimertypischen Veränderungen können unter anderem zu Einblutungen in das Parenchym oder in seltenen Fällen zu entzündlichen Vaskulitiden führen (Smith und Greenberg 2009; Holtzman et al. 2011)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Schwere der Hirnatrophie und der Alzheimer-Klinik nicht durch die Menge an unlöslichem Abeta bestimmt wird (Josephs et al. 2008). Vielmehr verdichten sich die Hinweise dafür, dass die Akkumulation von intraneuronalem $A\beta$ eng in die Alzheimer-Pathogenese involviert ist und möglicherweise weiteren neurodegenerativen Prozessen vorausgeht und diese sogar initiiert (Wirhth et al. 2004).

1.2.2 Neurofibrillenbündel

Ein weiteres neuropathologisches Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit ist das Vorkommen von Neurofibrillenbündeln (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT) bestehend aus dem Tau-Protein. Das Tau-Protein wird in allen Nervenzellen synthetisiert und dient physiologischerweise zur Regulation der Zusammenlagerung von Mikrotubuli (Holtzman et al. 2011). Bei der Alzheimer-Krankheit ist das Tau-Protein in abnormem Maße hyperphosphoryliert und in wesentlich höheren Konzentrationen nachweisbar als dies bei

gleichaltrigen Kontrollen der Fall ist (Khattoon et al. 1992). Durch die Dissoziation vom Mikrotubulus-System kommt es mit einer hohen Tendenz zur Aggregation zu einer Zusammenlagerung in Form gepaarter helikaler Filamente (engl. *paired helical filaments*; PHF) (Lee et al. 1991). Die Aggregatbildung führt zu gestörten Transportprozessen und vielerlei Dysfunktionen im Neuron und korreliert direkt mit dem Grad der Demenz bei betroffenen Individuen (Alonso et al. 1996). Welche Rolle das hyperphosphorylierte Tau-Protein jedoch in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielt, ist bisher noch unklar. Ein topographisches Verteilungsmuster der NFTs in sechs Stadien nach Braak lässt vermuten, dass sich die NFTs an anatomischen Strukturen ausbreiten und gut mit dem klinischen Status des Patienten korrelieren (Braak und Braak 1991; Vinters und Vonsattel 2000).

1.2.3 Hirnatrophie und Neuronenverlust

Neben Amyloid-Ablagerungen und NFTs gehört die Hirnatrophie zu den markantesten Veränderungen des Alzheimer-Gehirns und ist makroskopisch und durch bildgebende Verfahren darstellbar. In der Diagnostik sind bildgebende Verfahren seit geraumer Zeit etabliert und gehören zum differentialdiagnostischen Konzept zur Einstufung in die jeweilige Krankheitsphase (Zakzanis et al. 2003; Kang et al. 2017; Wirth et al. 2017). In Arealen mit prädominanter Tau-Pathologie und Nervenzellverlust ist die Atrophie am stärksten ausgeprägt (Whitwell et al. 2008) und konnte mit volumetrischen Messungen mittels MRT vor allem im medialen Temporallappen im Bereich der Amygdala, Hippocampus und *Gyrus parahippocampalis* korreliert werden (Bottino et al. 2002). Obwohl im *Gyrus temporalis inferior* und den *Gyri frontales superior et medius* eine Atrophie zu beobachten ist, so scheinen der *Gyrus orbito-frontalis* und der *Gyrus frontalis inferior* nicht betroffen zu sein (Double et al. 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das hippocampale Volumen linear mit der Neuronenzahl korreliert. Dies lässt darauf schließen, dass eine hippocampale Atrophie mit dem Verlust von Nervenzellen einhergeht (Kril et al. 2004). Mikroskopisch konnten mittels stereologischer Untersuchungen Verluste von Neuronen aufgedeckt werden, die eng mit der Klinik von Alzheimer-Patienten in Einklang gebracht werden können; dazu zählen unter anderem Verluste in den Hirnarealen der CA1-Region des Hippocampus (West et al. 1994), der Amygdala (Vereecken et al. 1994), des *Gyrus parahippocampalis* (Price et al. 2001) im Nucleus basalis Meynert (Vogels et al. 1990), im *Bulbus olfactorius* und *Nucleus olfactorius anterior* (ter Laak et al. 1994) und in Teilen des *Nucleus caeruleus* (Busch et al. 1997).

1.2.4 Entzündung

Reaktive Astrozytose, aktivierte Mikroglia, frühe Komponenten des Komplementsystems sowie diverse Zytokine und Chemokine sind Teil des inflammatorischen Prozesses (Duyckaerts et al. 2009). Beschädigtes Gewebe, die dauerhafte Anwesenheit inaktiver Substanzen, wie bspw. unlösliche A β -Aggregate und NFTs, aber auch zelluläre Nebenprodukte neurodegenerativer Prozesse, wie nackte DNA oder Neurofilamente,

zählen zu den klassischen Auslösern von Entzündungsreaktionen und der Aktivierung des Komplementsystems im Speziellen (Akiyama et al. 2000). In Hirnregionen, in denen solche auslösenden Faktoren gehäuft vorkommen, entsteht im Verlauf ein komplexes Zusammenspiel humoraler und zellulärer Aktivierung und Modulation, was letztendlich einen wichtigen Beitrag zur Alzheimer-Pathologie, einerseits, beiträgt. Andererseits gibt es Anhaltspunkte dafür, dass einige der inflammatorischen Prozesse zytoprotektive Eigenschaften zeigen (Mattson et al. 1995; Krause und Müller 2010).

Die Entzündungsreaktion als Angriffspunkt für therapeutische Interventionen wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht (McGeer et al. 1996; Hüll et al. 1999; Aisen et al. 2003; Tabet und Feldman 2003), hat jedoch bisher keinen Einzug in die leitliniengerechte Alzheimer-Therapie gefunden (Leitlinie Demenzen 2016).

1.3 Vom Amyloid-Vorläuferprotein (APP) zu toxischen A β -Peptiden

1.3.1 Das Amyloid-Vorläuferprotein

Seit der erstmaligen Isolation des vollständig komplementären DNA-Klons des Amyloid-Vorläuferproteins (Kang et al. 1987) ist das APP und seine Zusammenhänge in der Alzheimer-Pathogenese Gegenstand unzähliger Untersuchungen geworden und nimmt in seiner weiteren Prozessierung eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Alzheimer-Krankheit ein. Das APP ist ein allgegenwärtig exprimiertes Typ I integrales Glykoprotein mit den typischen Eigenschaften eines Zelloberflächenrezeptors. Das lange N-terminale Ende liegt dabei außerhalb der Zellmembran, wohingegen die kurze C-terminale Peptidkette ins Zytoplasma ragt (Dyrks et al. 1988). Die aus dem APP als späteres Spaltprodukt entstehende ≈ 40 Aminosäure lange A β -Peptidkette liegt dabei sowohl auf der extrazellulären als auch auf der transmembranen Domäne (Panegyres und Atkins 2011). Es ist das Produkt des auf Chromosom 21 lokalisierten, aus 19 Exons bestehenden *APP*-Gens und ist sowohl in menschlichem Hirngewebe, als auch in Muskulatur und peripherem Nervengewebe zu finden (Tanzi et al. 1987; Sisodia et al. 1993). Durch alternatives Splicing und posttranslationale Modifikation entstehen verschiedene Isoformen des APP, zu denen unter anderem APP695, APP751 und APP770 gehören und nach der Anzahl ihrer Aminosäuren benannt sind (Mullan et al. 1992; Panegyres und Atkins 2011). Die in neuronalen Strukturen am häufigsten vorkommende APP-Isoform ist das APP695 (van der Kant und Goldstein 2015). Die physiologische Funktion von APP ist noch nicht im Detail bekannt, jedoch scheint es eine Rolle bei der Bildung synaptischer Kontakte zwischen Zellen, beim Neuritenwachstum und bei der Regulation des intraneuronalen Kalziums zu spielen (Pangalos et al. 1995; Lautenschlager et al. 1999).

1.3.2 APP-Prozessierung

Im Rahmen der APP-Prozessierung kann durch eine Gruppe membrangebundener Enzyme, die sogenannten Secretasen, an spezifischen Positionen des APP eine proteolytische Spaltung erfolgen. Je nachdem welche Position als Angriffspunkt für die jeweilige Secretase dient, entstehen unterschiedliche Spaltprodukte mit unterschiedlichen Funktionen. Man unterscheidet bei der APP-Prozessierung zwei Wege: (1) den nicht-amyloidogenen Weg unter dem Einfluss der α - und γ -Secretasen und (2) den amyloidogenen Weg unter dem Einfluss der β - und γ -Secretasen.

1.3.2.1 Nicht-amyloidogener Weg

Bei der Prozessierung von APP auf nicht-amyloidogenem Weg wird APP zunächst an der extrazellulären Domäne durch ein Enzym mit α -Secretase-Aktivität gespalten. Dabei entstehen zwei Spaltprodukte: ein N-terminales, größeres und lösliches APP- α (soluble APP- α ; sAPP α) und ein kleineres, aus 83 Aminosäuren bestehendes C-terminales Fragment (CFT α ; C83) (Zheng und Koo 2006; Esposito 2011). Das bis dahin weiterhin membranständige C83 wird erneut, diesmal durch eine γ -Secretase, gespalten. Als Spaltprodukte entstehen dabei das intrazellulär verbleibende AICD50 (*APP intracellular domain*) und das extrazelluläre nicht-toxische p3 Fragment (A β _{17-40/42}) (Carrillo-Mora et al. 2014). Dadurch, dass APP zu Beginn innerhalb der A β -Sequenz gespalten wird, verliert das Spaltprodukt p3 seine Reaktionsfähigkeit zur Bildung neurotoxischer Aggregate (Selkoe 1994). Als Enzyme mit α -Secretase-Aktivität sind Vertreter aus der Familie der *A Disintegrin and Metalloproteinase* (ADAM) entschlüsselt worden; darunter besonders die Zink-abhängige Metalloproteinase ADAM10 (Allinson et al. 2003).

Somit entstehen auf nicht-amyloidogenem Weg Spaltprodukte, welche zum einen neuroprotektive Wirkungen zu haben scheinen (u. a. sAPP α) (Demars et al. 2011; Chasseigneaux und Allinquant 2012), zum anderen aber und das ist der entscheidende Punkt, keine A β -Varianten, welche gesteigerte Aggregationseigenschaften zeigen, wie dies auf amyloidogenem Weg der Fall ist.

1.3.2.2 Amyloidogener Weg

Bei der Prozessierung von APP auf amyloidogenem Weg wird APP zunächst wieder an der extrazellulären Domäne durch ein Enzym, diesmal mit β -Secretase-Aktivität, gespalten. Dabei entstehen zwei Spaltprodukte: ein N-terminales, größeres, lösliches APP- β (soluble APP- β , sAPP β) und ein kleineres, diesmal aus 99 Aminosäuren bestehendes C-terminales Fragment (CFT β ; C99) (Zheng und Koo 2006; Esposito 2011). Das membranständige C99 Fragment wird durch eine γ -Secretase in extrazelluläres A β und das intrazellulär verbleibende AICD gespalten. Die entstandenen A β -Peptide variieren in ihrer Länge von

34-50 Aminosäuren, je nachdem an welcher Stelle die γ -Secretase ihren Angriffspunkt hat (Kummer und Heneka 2014). Circa 90% der entstandenen $A\beta$ -Fragmente gehören zur Gruppe $A\beta_{40}$ -Spezies. Hingegen wird nur der kleinere Teil durch die $A\beta$ -Fragmente $A\beta_{42}$ und $A\beta_{43}$ bestimmt (van der Kant und Goldstein 2015). Hauptsächliches Augenmerk ist dabei auf das aus 42 Aminosäuren bestehende $A\beta_{42}$ -Monomer zu richten, das maßgeblich an der Bildung der bei der Alzheimer-Krankheit typischen Plaques beteiligt ist (Absatz 1.2.1 und Absatz 1.3.4). Zu den Hauptvertretern der Enzyme mit β -Secretase-Aktivität zählen die Enzyme BACE1 und BACE2 (*β -site APP converting enzyme*) (Hussain et al. 1999; Yan et al. 1999; Lin et al. 2000). Beides sind Typ-I-Membranproteine und gehören zur Gruppe der Aspartatproteasen. BACE1 verwendet als Substrat unter anderem das Transmembranprotein APP und spielt in der Alzheimer-Pathogenese die eigentliche Rolle (Yan 2017). Zur Funktion der einzelnen Spaltprodukte, die auf amyloidogenem und nicht-amyloidogenem Weg entstehen, wurde jüngst von Coronel *et al.* ein umfangreiches Review erstellt (Coronel et al. 2018). Interessant ist die wohl nicht zu vernachlässigende Rolle des bei der Aktivität der γ -Secretase entstehenden Spaltprodukts AICD. Einzig das AICD, das auf amyloidogenem Weg entsteht, formt einen Transkriptionskomplex mit Fe65, der die Expression verschiedener Gene reguliert; unter anderem auch die Gene von APP, BACE1 und ADAM10 (Beckett et al. 2012; van der Kant und Goldstein 2015). So scheinen die entstandenen Produkte des bei der Alzheimer-Krankheit pathologisch erhöhten amyloidogenen Wegs teils selbst in den möglichen Verlauf der Erkrankung einzugreifen bzw. diesen zu beeinflussen.

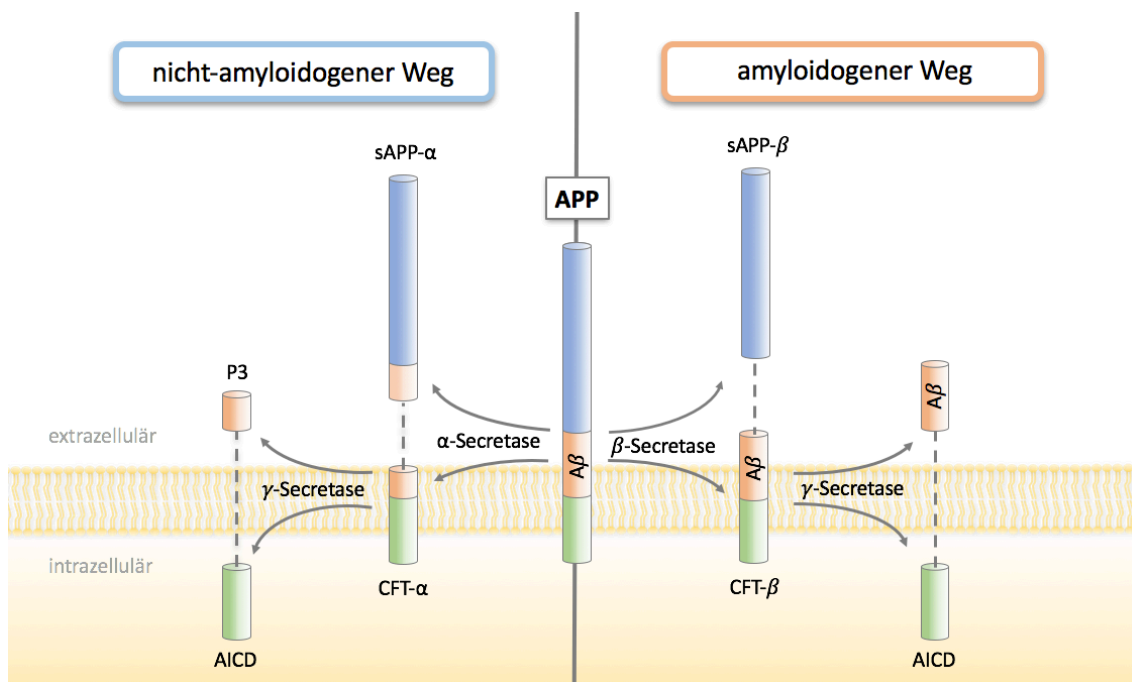


Abbildung 1: APP-Prozessierung. Das Amyloid-Vorläuferprotein kann auf zwei unterschiedlichen Wegen metabolisiert werden. Der nicht-amyloidogene Weg beschreibt die enzymatische Aufspaltung von APP mittels zweier Enzyme mit α - und γ -Secretase-Aktivität. Hierbei wird innerhalb der Aminosäuresequenz des A β -Peptids proteolytisch gespalten, sodass im Schritt der γ -Secretase keine A β -Peptide entstehen können. Spaltprodukte sind sAPP α , CFT α , P3 und AICD. Auf amyloidogenem Weg jedoch bleibt die A β -Domäne durch die β -Secretase unversehrt, was im Schritt der enzymatischen Spaltung durch eine γ -Secretase zur Liberation von löslichen A β -Monomeren nach extrazellulär führt. Darüber hinaus entstehen dabei die Spaltprodukte sAPP β , CFT β und AICD. Abbildung modifiziert nach Coronel et al. 2018.

1.3.3 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, erstmals von Hardy *et al.* im Jahre 1991 formuliert, diente als Erklärungsversuch zur Aufstellung einer Reihenfolge der pathophysiologischen Prozesse bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit. Die Entdeckung einer pathogenetischen Mutation im APP-Gen auf Chromosom 21 ließ sie vermuten, dass ein daraus resultierender Fehlmetabolismus des Amyloid-Vorläuferproteins und einem damit vermehrten Vorkommen von A β -Ablagerungen den Beginn des alzheimerspezifischen Krankheitsprozesses begründet. Sie postulierten, dass die Amyloid-Ablagerungen den weiteren pathophysiologischen Krankheitsprozess initiieren und weitere Korrelate wie Neurofibrillenbündel, Neuronenverlust, Hirnatrophie und schließlich kognitive Beeinträchtigungen darauf folgen (Hardy und Allsop 1991). Bestärkt wird diese Hypothese zweifellos durch die Erkenntnis über das Vorkommen von familiären Krankheitsereignissen, die durch Mutationen im APP-Gen, aber auch in den Präsenilin-Genen 1 und 2 hervorgerufen werden. Daraus resultierend kommt es zu erhöhten Amyloidspiegeln die wiederum die Ausbildung von Amyloid-Plaques begünstigen (Goate et

al. 1991; Duyckaerts et al. 2009; Cacace et al. 2016). Auch bei Individuen mit Down-Syndrom, bei welchen drei Kopien des *APP*-Gens vorliegen, kommt es während des Alterns mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Auftreten einer Alzheimer-Demenz mit charakteristischen histologischen Kennzeichen wie Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen (Masters et al. 1985; Goate et al. 1991).

Im Gegensatz dazu gibt es einige Widersprüche im Zusammenhang mit der ursprünglich formulierten Hypothese. So kann keine direkte Korrelation zwischen der Amyloidlast und dem Krankheitsstadium festgestellt werden, wohingegen die Menge von Neurofibrillenbündeln gut mit dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung in Einklang gebracht werden kann (Braak und Braak 1991; Morrison und Hof 1997; Wirths et al. 2004). Darüber hinaus zeigen viele Mausmodelle kognitive Beeinträchtigungen schon lange bevor eine Plaque-Pathologie in Erscheinung tritt (Walsh und Selkoe 2007). Auch konnte eine alleinige Reduktion der Plaque-Last durch Immuntherapie gegen $A\beta_{42}$ bei Alzheimer-Patienten nicht vor einer weiteren Neurodegeneration schützen (Holmes et al. 2008).

Seit den ersten Beobachtungen von intrazellulärem Abeta in einer differenzierten Nervenzelllinie (Wertkin et al. 1993), verdichteten sich die Hinweise immer mehr darauf, dass intrazelluläre $A\beta$ -Ansammlung lange vor der Ablagerung in unlöslichen extrazellulären Plaques eine entscheidende Rolle in der Alzheimer-Pathogenese einzunehmen scheinen. So kann diese Theorie dahingehend unterstützt werden, dass in jungen Patienten mit Down-Syndrom intrazelluläres $A\beta$ gefunden wurde, obwohl Plaques zum selben Zeitpunkt fehlten (Mori et al. 2002). Auch in unterschiedlichen Mausmodellen konnte die wichtige Rolle dieser intrazellulären Abeta-Ansammlungen verdeutlicht werden (Casas et al. 2004; Christensen et al. 2010; Bouter et al. 2013; Lopez-Noguerola et al. 2018). Beispielsweise konnte bei *APP/PS1KI*-Mäusen, welche zwei Mutationen für die familiäre Alzheimer-Krankheit tragen, signifikante Neuronenverluste im Hippocampus nachgewiesen werden, obwohl diese „nur“ intrazelluläres Abeta exprimierten ohne eine Tau-Pathologie zu zeigen (Casas et al. 2004). Es wurde also im weiteren Verlauf eine modifizierte Amyloid- β -Kaskaden-Hypothese formuliert, die die Wichtigkeit intrazellulärer $A\beta$ -Vorkommen als eines der ersten Ereignisse in der Alzheimer-Pathogenese unterstreicht (Wirths et al. 2004).

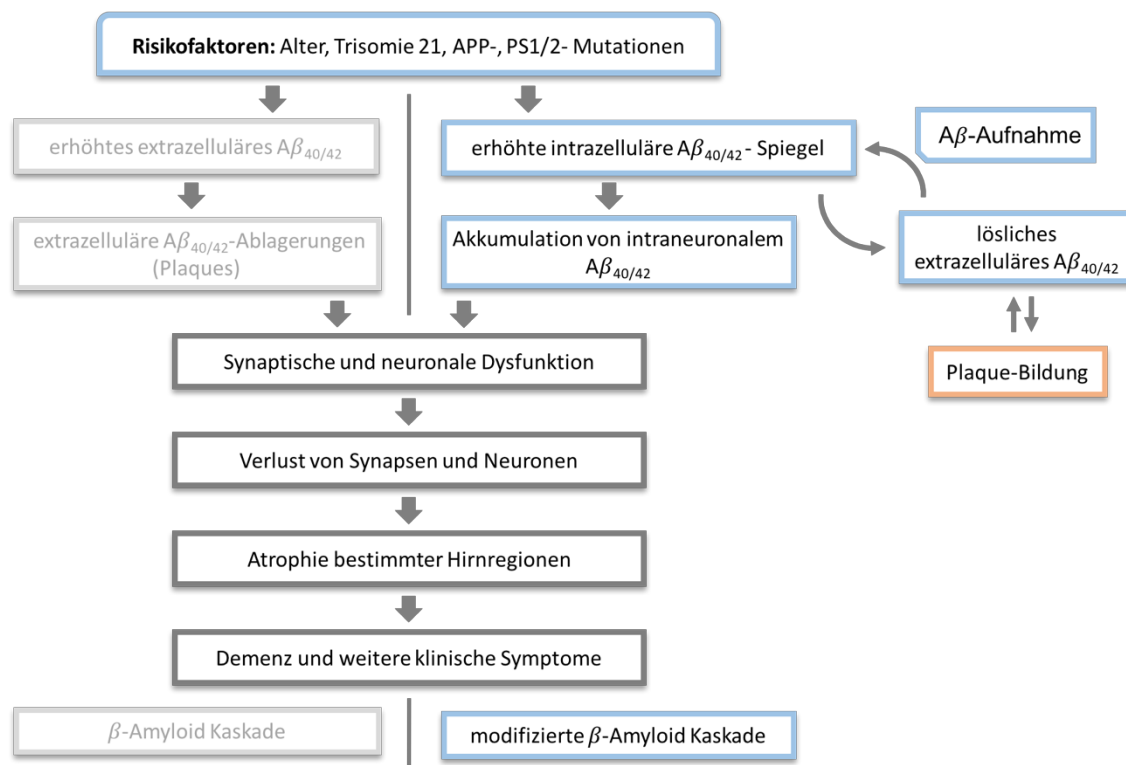


Abbildung 2: Schema zur β -Amyloid Kaskade (grau) und der modifizierten β -Amyloid-Kaskade (blau). Bei der modifizierten β -Amyloid-Kaskade steht die intraneuronale $A\beta$ -Akkumulation als primäres Ereignis im Zentrum der Alzheimer-Entstehung. Dabei führen zwei wesentliche Mechanismen zur Erhöhung intrazellulärer $A\beta_{42/42}$ -Spiegel: zum einen eine durch bestimmte Risikofaktoren begünstigte intraneuronale $A\beta$ -Produktion, zum anderen eine zusätzliche Aufnahme löslicher $A\beta$ -Peptide aus extrazellulären Reservoirs. So werden Amyloid-Plaques nun vielmehr als dynamische Strukturen und damit als zusätzliche Quelle löslicher $A\beta$ -Peptide angesehen. Darauf folgend kommt es zur Progression neuronaler/ synaptischer Dysfunktion und deren Verlust, bis hin zum Vollbild der Demenz. Modifiziert nach Wirths et al. 2004.

1.3.4 Amyloid- β -Varianten

Protein-Sequenzierungen aus Proben von Alzheimer-Gehirnen konnten eine große Heterogenität in Bezug auf den C- und N-Terminus von Amyloid- β -Peptiden demonstrieren (Masters et al. 1985; Selkoe 1994). Bei der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch β - und γ -Secretase-Aktivität entstehen im Besonderen zwei Hauptvertreter von $A\beta$ -Volllängenpeptiden, $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$, die jeweils aus einer Sequenz von 40 bzw. 42 Aminosäuren bestehen. Zudem können die aus Hirngewebe von Alzheimer-Patienten isolierten $A\beta$ -Varianten in der Länge zwischen 39 bis 43 Aminosäuren variieren (Sandebning et al. 2013; van der Kant und Goldstein 2015). Die genaue Position der enzymatischen γ -Spaltung spielt dabei eine entscheidende Rolle für das Aggregationsverhalten und die daraus resultierende Toxizität der $A\beta$ -Varianten, da nur $A\beta_{42}$ eine hohe Tendenz zur Bildung von Oligomeren *in vivo* zeigt (Haass und Selkoe 2007) (Absatz 1.3.4.2).

Neben Vollängen-A β , welche mit Aspartat an Position 1 des N-Terminus beginnen, sind eine Vielzahl von N-terminal trunkierter und teils modifizierter A β -Varianten identifiziert worden. Zu diesen zählen unter anderem das N-trunkierte A β_{4-42} und das N-trunkierte und im Anschluss modifizierte A β_{pE3-42} (Jawhar et al. 2011). Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass A β_{1-40} , A β_{1-42} , A β_{4-42} und A β_{pE3-42} die dominanten Fraktionen in Hippocampus und Kortex von Alzheimer-Patienten darstellen (Portelius et al. 2010). Charakteristisch für N-trunkierte A β -Peptide sind im Vergleich zu Vollängenpeptiden ihre verstärkten toxischen Eigenschaften. So konnte beispielsweise mithilfe von Sedimentationsanalysen demonstriert werden, dass Deletionen des N-Terminus mit erhöhtem Aggregationsbestreben zu unlöslichen, neurotoxischen β -Faltblatt-Fibrillen *in vitro* einhergingen (Pike et al. 1995). Auch wenn die genauen enzymatischen Aktivitäten in vielen Fällen noch nicht vollends verstanden sind, so konnten dennoch in der Vergangenheit unter anderem Enzyme wie beispielsweise das *β -site APP converting enzyme* (BACE1) (Vassar et al. 1999), die Metalloprotease Meprin- β (Bien et al. 2012) und die Zink-Metalloprotease Neprilysin (Iwata et al. 2001) mit der Generierung von N-trunkierten A β -Varianten in Verbindung gebracht werden (Bayer und Wirths 2014).

1.3.4.1 Amyloid- β_{4-42} und Amyloid- β_{pE3-42}

Das am Amino-Terminus trunkierte A β_{4-42} gehört zusammen mit A β_{1-42} , A β_{1-40} und A β_{pE3-42} zu den am häufigsten anzutreffenden A β -Isoformen im Kortex und Hippocampus von Alzheimer-Patienten (Portelius et al. 2010). Bereits eine im Jahr 1985 von Master *et al.* durchgeführte Sequenzanalyse an Amyloid-Plaque-Core-Proteinen (APC) identifizierte die Mehrheit (64%) der sequenzierten Proteine als Vertreter mit Phenylalanin-Rest, welche mit Position 4 der Aminosäuresequenz des Vollängen-Peptids korrespondierten (Masters et al. 1985). Einige Jahre später, im Jahre 1992, konnte schließlich auch das Peptid A β_{pE3-42} , welches ein Pyroglutamat an Position 3 der Aminosäuresequenz trägt, durch Mori *et al.* identifiziert werden (Mori et al. 1992). Die Generierung des Pyroglutamat-modifizierten A β -Peptids ist ein mehrstufiger Prozess, der im ersten Schritt das Entfernen der beiden ersten Aminosäuren, Aspartat und Alanin, des A β -Vollängenpeptids, vornehmlich durch das Enzym Aminopeptidase A, beinhaltet. Nach Freilegung des Glutamat-Rests an Position 3 (A β_{3E}) katalysiert das Enzym Glutaminylzyklase (QC) unter Abspaltung von Wasser die Reaktion von Glutamat zu Pyroglutamat (A β_{pE3}) (Jawhar et al. 2011). Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften, begünstigt durch Pyroglutamat an Position 3, kann A β_{pE3} nur sehr schlecht durch Peptidasen abgebaut werden, was die Stabilität im Vergleich zu anderen A β -Peptiden erhöht (Saido et al. 1995; He und Barrow 1999).

In-vitro-Analysen von Pike *et al.* demonstrierten, dass Deletionen des N-Terminus mit einem erhöhten Aggregationsbestreben einhergingen (Pike et al. 1995). Ergänzend dazu fanden Bouter *et al.* heraus, dass vor allem $A\beta_{4-42}$ und $A\beta_{PE3-42}$, und in geringerem Maße auch $A\beta_{1-42}$ beachtenswerte Tendenzen zur Bildung stabiler Aggregate zeigen. Darüber hinaus kam es bei einer Behandlung von primären Neuronen mit gerade diesen Peptiden zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität (Bouter et al. 2013).

In-vivo-Effekte konnten durch intraventrikuläre Injektion von N-trunkierten $A\beta$ -Peptiden an Wildtyp-Mäusen untersucht werden. So gab es einen signifikanten Behandlungseffekt im Sinne einer Einschränkung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses bei mit $A\beta_{4-40}$ und $A\beta_{4-42}$ behandelten Mäusen (Bouter et al. 2013). Darüber hinaus sind eine Vielzahl von Mausmodellen generiert worden, an welchen *in-vivo*-Effekte chronischer Belastung von N-trunkierten $A\beta$ -Varianten untersucht werden können (Wirths et al. 2009; Alexandru et al. 2011; Wittnam et al. 2012; Bouter et al. 2013; Lopez-Noguerola et al. 2018). So fand man beispielsweise bei Tg4-42-Mäusen, welche ausschließlich humanes $A\beta_{4-42}$ exprimieren und keine Plaque- und Tau-Pathologie zeigen, signifikante Neuronenverluste in der CA1-Region des Hippocampus. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass eine Langzeitexposition von $A\beta_{4-42}$ Defizite im räumlichen Arbeitsgedächtnis bei diesen Mäusen bewirkt (Bouter et al. 2013). Auch eine chronische $A\beta_{PE3-42}$ -Exposition führt beispielsweise bei TBA42-Mäusen zu einem Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus und induziert zudem deutliche Verhaltensdefizite (Meißner et al. 2015).

1.3.4.2 Aggregation und Toxizität

Bei der Zusammenlagerung von Amyloid- β zu Plaque-Formationen bilden sich Zwischenprodukte unterschiedlicher Größe, Form und Löslichkeit (Rochet und Lansbury 2000). Grundbausteine des Aggregationsprozesses sind dabei $A\beta$ -Monomere, welche bei der enzymatischen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch β - und γ -Secretase-Aktivität (Absatz 1.3.2) entstehen. Ein durch Produktion und Abbau kontrollierter Gleichgewichtszustand von $A\beta$ kann, vor dem Hintergrund der modifizierten Amyloid-Hypothese (Absatz 1.3.3), durch bestimmte Risikofaktoren in ein Ungleichgewicht zu Gunsten höherer Konzentrationen von löslichem Abeta versetzt werden (Wirths et al. 2004; Selkoe und Hardy 2016). Bei Überschreitung kritischer Konzentrationen kann es zur Selbst-Aggregation von $A\beta$ -Monomeren zu löslichen Dimeren, Trimeren und Oligomeren unterschiedlicher Länge kommen, wobei die Mehrheit durch kleinere Oligomere in einer Länge von Dimeren bis hin zu Oktameren bestimmt wird (Walsh und Selkoe 2007). Aus diesem noch nicht fibrillären Zustand heraus können die löslichen Oligomere weiter zu Proto- und schließlich zu $A\beta$ -Fibrillen, dem Hauptbestandteil von Plaques, aggregieren (Kumar et al. 2011; Benilova et al. 2012). Wenn auch die Anzahl der Plaques nur ein sehr schlechtes neuropathologisches Korrelat der Demenz darstellt, so korreliert eine verminderte Anzahl an Synapsen in Hippocampus und Neokortex sehr gut mit der

Ausprägung kognitiver Beeinträchtigungen (Selkoe und Hardy 2016). Shankar *et al.* demonstrierten, dass kleinere A β -Oligomere sowohl die synaptische Funktion (z. B. die Langzeitpotenzierung) als auch die synaptische Struktur (z. B. dendritische Spines) beeinträchtigen können (Shankar et al. 2007). Auf molekularer Ebene betrachtet, könnte es möglich sein, dass A β -Oligomere in die Signaltransduktion bestimmter NMDA- oder AMPA (α -amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazol)-Rezeptoren an der synaptischen Plasmamembran interagieren und somit eine Langzeitpotenzierung beeinträchtigen (Haass und Selkoe 2007).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die modifizierte Amyloid-Kaskade beschreibt eine intraneuronale A β -Produktion und Akkumulation als eines der frühesten Ereignisse in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung (Absatz 1.3.3). In diesem Zusammenhang wird den beiden hoch-neurotoxischen A β -Varianten A β_{4+42} und A β_{pE3-42} eine bedeutende Rolle im Entstehungsprozess zu gesprochen (Absatz 1.3.4).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Einflüsse dieser beiden A β -Varianten *in vivo* an ausgewählten Mausmodellen zu untersuchen. Dafür werden die Mausmodelle Tg4-42 (Bouter et al. 2013), TBA42 (Wittnam et al. 2012) und das jüngst generierte Bigen-Mausmodell (Lopez-Noguerola et al. 2018) verwendet. Im Zentrum der Arbeit stehen hierfür detaillierte Auswertungen der Neuronenzahl mittels Design-basierter Stereologie.

Zu Beginn findet eine Analyse der CA1-Region des Hippocampus, des Striatums und des piriformen Kortex bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Tieren statt. Ergänzend zu bereits in der Vergangenheit erhobenen Daten zum Tg4-42-Mausmodell (Bouter et al. 2013; Antonios et al. 2015) wird darüber hinaus die neuroinflammatorische Reaktion auf die chronische Belastung von A β_{4+42} im Bereich des Kortex-Areal untersucht. So wird die Aktivität von Mikrogliazellen mit und ohne Behandlung eines für N-trunkierte A β -Peptide spezifischen Antikörpers NT4X vergleichend ausgearbeitet. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden dann die Neuronenzahlen der CA1-Region des Hippocampus von Tg4-42 homo- und hemizygoten, TBA42 homo- und hemizygoten und bigenen Tieren zum Zeitpunkt von 3 und 6 Monaten ausgewertet und gegenübergestellt.

Im Detail wird folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- 1) Welche Hirnregionen exprimieren A β_{4+42} im Tg4-42-Mausmodell?
- 2) Findet sich ein Neuronenverlust im Hirnareal Striatum im Tg4-42-Mausmodell?
- 3) Findet sich ein Neuronenverlust im Hirnareal piriformer Kortex im Tg4-42-Mausmodell?
- 4) Führt eine passive Immunisierung durch NT4X zu einer Verbesserung der Mikrogliose im Kortex-Areal?

-
- 5) Findet sich ein Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus von Tg4-42- und TBA42-Mäusen?
 - 6) Findet sich ein Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus von bigenen Mäusen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kits

In Tabelle 1 sind alle Chemikalien, Reagenzien und Kits, die bei nachfolgend beschriebenen Experimenten verwendet wurden, in alphabetischer Reihenfolge mit Herstellerinformationen aufgelistet.

Tabelle 1: Chemikalien, Reagenzien und Kits

<i>Substanz/ Reagenz/ Kit</i>	<i>Hersteller, Stadt, Land</i>
<i>100 bp DNA Ladder</i>	Bioron GmbH, Ludwigshafen, D
<i>Agarose SeaKem® LE (Pulverform)</i>	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
<i>Ameisensäure (Methansäure) (98%)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Avidin-Biotin-Complex (ABC) – Vectastain Kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Borsäure</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Citronensäure</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>DAB-Peroxidase-Substrate-Kit SK4100</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>4',6-Dimidin-2-phenylindol (DAPI)</i>	DakoCytomation, Glostrup, DK
<i>Fluoreszenz-Einbettmedium</i>	
<i>Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)</i>	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
<i>Essigsäure (100%)</i>	MERCK KGaA, Darmstadt, D
<i>Ethanol 99% vergällt (EtOH)</i>	ChemSolute Geyer GmbH, Renningen, D
<i>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
<i>Fetales Kälberserum (FCS)</i>	Biochrom GmbH, Berlin, D
<i>HD Green Plus DNA Stain</i>	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
<i>Hämatoxylin-Lösung</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Isopropanol (2-Propanol)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

<i>Ketamin 10%</i>	Medistar GmbH, Ascheberg, D
<i>Kresylviolett</i>	Fluka Chemie, München, D
<i>Lysepuffer</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Magnesiumchlorid (MgCl₂)</i>	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, D
<i>Milchpulver (fettarm)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Natriumacetat-Trihydrat</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Natriumchlorid (NaCl)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Natriumlaurylsulfat (SDS)</i>	Biomol GmbH, Hamburg, D
<i>Paraffin</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Phosphatgepufferte Formaldehydlösung (PFA) Roti®-Histofix 4%</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Phosphate-Buffered-Saline (PBS)</i>	Biochrom GmbH, Berlin, D
<i>Primer 1 Aβ3-42 for2 5'3' - TCCGGCCAGAACGTCGATTC</i>	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
<i>Primer 2 Aβ3-42 rev2 5'3' - GGAGAAGCAAGACCTCTGC</i>	Eurofins Genomics, Ebersberg, D
<i>Proteinase K</i>	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
<i>Reinstwasser (dH₂O) (ultraPure Filtered Water)</i>	Bayer AG, Göttingen, D
<i>Roti®-Histokit Einbettmedium</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Saccharose-Lösung D(+) 30%</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Taq-Polymerase</i>	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern, D
<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris/HCL)</i>	MERCK KGaA, Darmstadt, D
<i>Triton X-100™ (Alkylphenylpolyethylenglykol)</i>	MERCK KGaA, Darmstadt, D (ehem. Sigma)
<i>Wasserstoffperoxid (H₂O₂)</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Xylol</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

2.1.2 Elektronische Geräte

In Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten elektronischen Geräte in alphabetischer Reihenfolge mit Herstellerinformationen aufgelistet.

Tabelle 2: Geräteliste

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller, Stadt, Land</i>
<i>BlueCube 300</i>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
<i>EVOS® FL Color</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Heraeus Wärmeschrank</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>HistoCore Arcadia C - Cold Plate</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
<i>Kryostat CM1850 UV</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
<i>Microtom Microm HM335</i>	Microm, Walldorf, D
<i>Mikroskop-Kamera Moticam Pro 282A</i>	Motic Asia, Kowloon, Hong Kong, CHN
<i>Mikroskop Olympus BX51</i>	Olympus, Shinkuju, JPN
<i>Mikrowelle NN-E201 WM</i>	Panasonic, Kadoma, Japan
<i>NanoDrop One C Photospectrometer</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Netzteil Elektrophorese MP-300V</i>	Major Science, Saratoga, CA, USA
<i>Paraffin Einbett-Station LEICA EG 1140H</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
<i>Thermocycler (Labcycler)</i>	SensoQuest, Hamburg, D
<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
<i>Tissue Processor TP1020</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
<i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
<i>Waage / Laborwaage</i>	OHAUS Europe GmbH, Greifensee, CH
<i>Wärmebad MEDAX</i>	Nagel GmbH, Kiel, D

2.1.3 Sonstige Utensilien und Produkte

In Tabelle 3 sind weitere Utensilien und Produkte, die während des Arbeitsprozesses Verwendung fanden, in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Tabelle 3: Sonstige Utensilien und Produkte

<i>Utensilien</i>	<i>Hersteller, Stadt, Land</i>
<i>Einbettkassetten Rotilabo®</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<i>Elektrophoresekammer BlueMarine™ 100 + 8 Kammer-Gelkamm 1mm</i>	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
<i>Eppendorf Cups</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
<i>Faltenfilter 150mm</i>	GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK
<i>IVC-Käfig</i>	Tecniplast, Hohenpeißenberg, D
<i>Lipidstift Pap Pen</i>	Kisker Biotech, Steinfurt, D
<i>12-Lochplatte Corning Costar Nettwell Plates</i>	Corning, New York, USA
<i>Menzel-Gläser 24 x 60 mm Deckgläschen</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Microtome Blades C35</i>	Feather, Osaka, JPN
<i>Objektträger Superfrost®</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>PCR-Gefäße 0,2ml</i>	Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, A
<i>Pipetten</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
<i>Tissue-Tek® O.C.T Compound Kleber</i>	Sakura Finetek GmbH, Staufen, D
<i>Transferpipetten 3,5ml</i>	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

2.1.3 Antikörper

In Tabelle 4 (primäre Antikörper) und 5 (sekundäre Antikörper) sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Die in den jeweiligen Projekten verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind ebenfalls in dieser Liste zu finden.

Tabelle 4: Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Host</i>	<i>Epitop</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
1-57	Maus	A β _{pE3-x}	1:500	AG Bayer* ¹	fluor. IH
IBA-1	Meerschwein	Iba1 (Mikroglia)	1:1000	Wako	IH
NT4X	Maus	A β _{p1-42} , A β _{pE3-x} , A β _{+x}	1:100	AG Bayer* ²	I
Solanezumab _{BS} (biosimilar)	humanisiert	mittlere A β - Domäne	1:2500 1:5000	Eli Lilly	fluor. IH FF

*¹: (Wirhth et al. 2010); *²: (Antonios et al. 2013)

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Host</i>	<i>Verbindung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
<i>Anti-Maus</i>	Hase	biotinyliert	1:200	Jackson	IH
<i>Anti-Meerschwein</i>	Esel	biotinyliert	1:200	Jackson	IH
<i>Anti-human</i>	Ziege	biotinyliert	1:250	Jackson	FF
<i>Anti-Maus (594nm)</i>	Ziege	fluoreszierend	1:200	ThermoFisher	fluor. IH
<i>Anti-Maus (488nm)</i>	Esel	fluoreszierend	1:200	ThermoFisher	fluor. IH
<i>Anti-human</i>	Esel	Fluoreszierend	1:200	ThermoFisher	fluor. IH

Verwendungszweck: (I) Immunisierung, (IH) Immunhistochemie, (fluor. IH) Fluoreszenz-Immunhistochemie, (FF) free-floating

2.2 Tiere

2.2.1 Haltungsbedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere gehörten zur Spezies der Hausmaus (*Mus musculus*). Wildtyp-Tiere entstammten der Mauslinie C57BI/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Von autorisiertem Fachpersonal wurden die Tiere nach den Vorgaben der „Gesellschaft für Versuchstierkunde“ (GV-SOLAS) und der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) behandelt. Durch das „Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit“ wurden alle durchgeführten Tierexperimente genehmigt und ausschließlich durch speziell ausgebildete Mitarbeiter durchgeführt. Unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF) wurden die Mäuse verpaart und gehalten. Dazu wurden sie in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) in einzeln belüfteten IVC-Käfigen mit den Maßen 32 x 15 x 14,5 [cm] gehalten. Wasser und Futter standen frei zur Verfügung. Die Anzahl der Tiere wurde so klein wie möglich gehalten; auch wurde größter Wert auf Reduktion und Vermeidung von Leid und Schmerz gelegt.

2.2.2 Transgene Mauslinien

In dieser Arbeit wurden sowohl homo- als auch hemizygoten Mäuse aus den transgenen Mauslinien Tg4-42 (Tg4-42_{hemi} und Tg4-42_{hom}) und TBA42 (TBA42_{hemi} und TBA42_{hom}) verwendet. In einem späteren Teil der Arbeit wurde darüber hinaus die Mauslinie der Bigenen, einer Kreuzung aus Tg4-42_{hom} und TBA42_{hom}, verwendet.

2.2.2.1 Tg4-42-Mauslinie

Die Tg4-42-Mauslinie exprimiert an das mausspezifische Thyrotropin-Signal-Peptid gekoppelte humane A β ₄₋₄₂-Peptid unter der Kontrolle des neuronalen Thy-1 Promotors und wurde bereits ausführlich beschrieben. Dabei wird das Prä-Pro-TRH-A β ₄₋₄₂-Fusionspeptid über das endoplasmatische Retikulum und weiterer Prozessierung im Golgi-System schließlich als frei lösliches A β ₄₋₄₂ sezerniert (Bouter et al. 2013). Auf diesem Wege konnte ein transgenes Mausmodell geschaffen werden, das Tg4-42-Mausmodell, welches ausschließlich lösliches humanes N-trunkiertes A β ₄₋₄₂ exprimiert und somit die Grundlage für ein detailliertes Verständnis der Eigenschaften und daraus resultierenden Behandlungsoptionen ermöglicht.

2.2.2.2 TBA42-Mauslinie

Die Entwicklung der TBA42 Mauslinie wurde bereits ausführlich beschrieben (Cynis et al. 2006; Wirths et al. 2009; Wittnam et al. 2012). Kurz gesagt, TBA42 Mäuse exprimieren an

das mausspezifische Thyrotropin-Releasing-Hormon-A β (mTRH-A β_{3-42}) gekoppelte A β_{3-42} unter der Kontrolle der mausspezifischen Thy1.2 regulatorischen Einheit. Dabei wurde die Aminosäure Glutamat an Position 3 der Aminosäurekette in Glutamin umgewandelt, um die Bildung von Pyroglutamat (A β_{pE3-42}) durch die Glutaminylzyklase (QC) zu erleichtern.

2.2.2.3 Bigene Mauslinie

Die bigene Mauslinie wurde durch Anzucht aus Tg4-42 und TBA42 positiven Mäusen erzeugt. Die so entstanden bigenen Tiere exprimieren in etwa gleichem Maße A β_{4-42} als auch A β_{pE3-42} (Lopez-Noguerola et al. 2018). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass beide A β -Varianten eine entscheidende Rolle in der Alzheimer-Pathogenese spielen (Bouter et al. 2013; Meißner et al. 2015) und sich *in vitro* schnell zu toxischen Aggregaten zusammenlagerten (Bouter et al. 2013). Somit wurde ein Mausmodell entwickelt, welches eine detaillierte Analyse der Auswirkungen der Ko-Expression beider A β -Varianten *in vivo* ermöglicht.

2.2.3 Vorbereitung der Hirnproben durch autorisiertes Personal

Alle bearbeiteten und analysierten Gewebeproben wurden ausschließlich durch geschultes Personal der Arbeitsgruppe Molekulare Psychiatrie zuvor vorbereitet. Die vorbereitenden Schritte beinhalteten die artgerechte Betreuung der Tiere (Absatz 2.2.1), Immunisierung während der Aufzucht (Absatz 2.2.3.1), Durchführung von Verhaltenstests, fachgerechte Tötung unter einer CO₂-Anästhesie mittels zervikaler Dislokation und Präparation des Schädels mit anschließender Konservierung beider Großhirnhemisphären. Dazu wurde die rechte Hemisphäre nach Fixierung in Paraformaldehyd (PFA) und anschließender Lagerung bei 4 °C in 30%iger Saccharoselösung - bis zum vollständigen Absinken des Gehirns – mittels Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die linke Hemisphäre wurde in RotiLabo® Einbettkassetten verpackt und für mindestens 72 Stunden in einer 4%igen phosphatgepufferten Formaldehydlösung (Roti-Histofix) gelagert.

2.2.3.1 Immunisierung mit dem Antikörper NT4X

Die Immunisierung erfolgte nach dem von Antonios et al. (2015) beschriebenen Immunisierungsprotokoll (Antonios et al. 2015).

Zur passiven Immunisierung der Tg4-42_{hom}-Mäuse wurde der Antikörper NT4X verwendet. Die passive Immunisierung wurde mittels intraperitonealer Injektion des Antikörpers in einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht verdünnt in einer sterilen PBS-Lösung mit pH 7,4 durchgeführt. Ab einem Alter von 3 Monaten erhielten Tg4-42_{hom}-Mäuse über einen Zeitraum von 12 Wochen je eine Injektion wöchentlich (Abbildung 3).

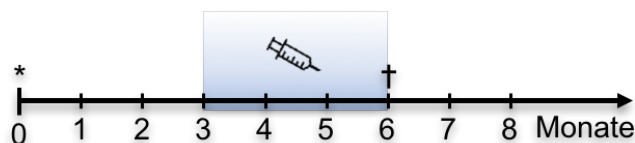


Abbildung 3: Immunisierungsprotokoll. (blau) Immunisierungszeitraum, (*) Geburt; (†) Tötung nach der letzten Injektion im Alter von 6 Monaten.

2.2.3.2 Der Antikörper NT4X

Der murine monoklonale Antikörper NT4X gehört zur Klasse der IgG2b Antikörper und ist speziell gegen N-trunkierte A β -Varianten gerichtet. *In-vitro*-Untersuchungen zeigten, dass NT4X unter natürlichen Bedingungen mit den N-trunkierten A β -Varianten A β_{pE3-40} , A β_{pE3-42} , A β_{4-40} und A β_{4-42} reagierte. Entscheidend für seine Bindungsfähigkeit ist dabei Phenylalanin an Position 4 der Aminosäuresequenz. Ein Austausch von Phenylalanin mit Alanin (A β_{4A}) oder Prolin (A β_{4P}) verhinderte hingegen gänzlich die Bindung von NT4X an die getesteten Peptide (Antonios et al. 2013). Untersuchungen zum Bindungsverhalten zeigten, dass NT4X einerseits eine frühe intraneuronale A β -Akkumulation in homozygoten 5XFAD-transgenen Mäusen im Alter von 6 Wochen erkannte, andererseits seine Affinität zu Plaque-assoziiertem Abeta, sowohl in sporadischen als auch familiären Alzheimer-Fällen, deutlich reduziert war (Antonios et al. 2013). NT4X konnte *in vitro* und *in vivo* die Toxizität bestimmter N-trunkierter A β -Varianten herabsetzen. *In vitro* schützte NT4X beispielsweise primäre Neurone in einem Calcein-Assay vor A β_{4-42} Peptiden (Antonios et al. 2013). Auch *in-vivo*-Studien demonstrierten den protektiven Effekt von NT4X. So wirkte dieser sowohl Defiziten im räumlichen Arbeitsgedächtnis als auch einem Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen entgegen (Antonios et al. 2015). Darüber hinaus reduzierte NT4X die fibrilläre und totale Anzahl von Amyloid-Ablagerungen (insbesondere die aus A β_{3-x} bestehenden Plaques) in 5XFAD-passiv immunisierten Mäusen im Vergleich zu einer nur mit der Antikörperträgerlösung PBS injizierten Kontrollgruppe (Antonios et al. 2015).

2.3 Methoden

2.3.1 Identifikation der Mauslinien

Eine genaue Identifikation des Genotyps mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Real-Time-PCR (RT-PCR) wurde bereits in Vorarbeiten durchgeführt. Zur Validierung dieser Ergebnisse wurde stichprobenartig aus Schwanzbiopsien isolierte DNA mittels PCR amplifiziert. In einer darauffolgenden Gelelektrophorese konnten dann die transgenen Mauslinien durch eine gemeinsame charakteristische Bande vom Wildtyp unterschieden werden (Absatz 2.3.1.1 – 2.3.1.4). Danach wurde mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbungen (Absatz 2.3.3.2) das für das jeweilige Mausmodell spezifische A β -Peptid nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Absatz 3.1 beschrieben.

2.3.1.1 DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien

Als Grundlage für die DNA-Isolation wurden jeweils etwa 2 mm x 2 mm große Schwanzbiopsate in beschriftete 1,5-ml-Eppendorfgefäße zusammen mit 200 μ l Lysepuffer [100 mM Tris/HCl pH8,5; 5 mM EDTA (M292,25); 0,2% Natriumlaurylsulfat (SDS); 100 mM NaCl (M58,44)] gegeben. Es war darauf zu achten, dass Proteinase K (10 μ l/ml in wässriger Lösung) erst kurz vor Gebrauch zum Lysepuffer frisch hinzugegeben wurden. Im Anschluss folgte eine 20-stündige Inkubation (über Nacht) der Proben bei 56 °C im Thermomixer compact bei 450 U/min bis zur vollständigen Lyse des Gewebes. Nach Inkubation im Lysepuffer wurden die Proben mit 17000 U/min bei 4 °C für 20 Minuten abzentrifugiert. Jeweils 200 μ l kaltes Isopropanol wurde in neu beschriftete Eppendorfgefäße vorgelegt und die Überstände der zentrifugierten Proben hinzupipettiert. Durch Schwenken der Proben wurden nun DNA-Präzipitate in Form feiner Fäden sichtbar. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten mit 13000 U/min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Die zurückgebliebenen DNA-Pellets wurden mit 200 μ l kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 13000 U/min zentrifugiert. Der Waschschriff mit Ethanol wurde einmal wiederholt, um sie bestmöglich für die spätere DNA-Messung vorzubereiten. Die Ethanolreste wurden anschließend abpipettiert. Bei 56 °C wurden die DNA-Pellets im Thermomixer für ca. 60 Minuten getrocknet und schließlich in 30 μ l Reinstwasser über Nacht im Thermomixer compact bei 56 °C gelöst. Danach konnten die Proben bei 4 °C gelagert werden.

2.3.1.2 Messen der DNA-Konzentration

Mittels NanoDrop One C Spektrophotometer wurde die DNA-Konzentration und Reinheit gemessen. Dazu wurden 2 μ l der zu messenden DNA-Probe auf den Messarm des Photometers gegeben. Für die DNA-Proben wurde ein Extinktionskoeffizient größer 1,8 für A260/A280 und A260/A230 als ausreichend konzentriert und rein angesehen. Mit der

ermittelten Konzentration konnte dann eine einheitliche Verdünnung von 20 ng/ μ l der jeweiligen Probe hergestellt werden.

2.3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung wurde die aus Schwanzbiopsien extrahierte DNA verwendet (Absatz 2.3.1.1). Aus der in Absatz 2.3.1.2 hergestellten Probenverdünnung wurde 2 μ l mit 18 μ l eines PCR-Mastermixes [10,2 μ l aqua bidest, 2 μ l 10x Reaktionspuffer, 1,6 μ l MgCl₂ (25mM), 2 μ l dNTP, 1 μ l Primer 1 A β ₃₋₄₂ for2 (5'3'-Sequenz-TCCGGCCAGAACGTCGATTC), 1 μ l Primer 2 A β ₃₋₄₂ rev2 (5'3'-Sequenz-GGAGAAGCAAGACCTCTGC) 0,2 μ l Taq-Polymerase (5U/ μ l)] in 0,2-ml-PCR-Gefäße gegeben. Die Amplifizierung der DNA-Proben wurde in einem LabCycler (SensoQuest) nach in Tabelle 6 dargestelltem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 6: PCR-Zyklus-Protokoll des LabCycler für Nukleinsäure-Amplifikation

<i>Schritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
1	3 min	94 °C
2	45 s	94 °C
3	1 min	58 °C
4	1 min	72 °C
5	Schritt 2-4 insg. 35 Wiederholungen	
6	5 min	72 °C
7	∞	4 °C

2.3.1.4 DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse der in Absatz 2.3.1.3 erhaltenen Nukleinsäure-Produkte wurde zunächst ein 2 %iges Agarose-Gel gegossen. 50 ml 5x TBE-Puffer [pH8,3; für 1 Liter: 54,5 g/l Trisbase, 27,8 g/l Borsäure, 20 ml 0,5 M Na₂EDTA pH8, auf 1000 ml ddH₂O aufgefüllt] wurde mit 200 ml ddH₂O Wasser zu einem 1x TBE-Puffer verdünnt. Dann wurden 35 ml des 1x TBE-Puffers mit 0,7 g Agarosepulver versetzt und bei 200 W in der Mikrowelle aufgeköcht bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Nachdem die leicht visköse Flüssigkeit auf 65 °C abgekühlt war, wurden 2 μ l HD Green Plus Safe DNA unter einem Laborabzug hinzugegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Anschließend wurde die Lösung in eine Gießschale mit einem Probenkamm für 8 Probenkammern gegossen und unter Abzugsluft abgekühlt. Nun konnte das Gel vorsichtig in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben werden. 10 μ l der DNA-Probe wurden mit 2 μ l Ladepuffer vermischt und vorsichtig in die Ladekammern des Agarosegels pipettiert. Als

Referenz diente die 100bp DNA-Ladder. Positiv- und Negativkontrollen wurden ergänzt. Das Gel lief für ca. 30 - 45 Minuten bei einer Spannung von 135V. Die Auswertung des Gels fand mithilfe eines BlueCube 300 unter UV-Licht mit 312 nm Wellenlänge und einer Belichtungszeit von 3000 ms statt. Die Ergebnisse sind in Absatz 3.1.1 dargestellt.

2.3.2 Anfertigung der Hirnschnitte

2.3.2.1 Anfertigung der Hirnschnitte am Kryostat

Für die stereologische Analyse wurde jeweils die bei -80 °C gelagerte und mit 4% PFA perfundierte, rechte Großhirnhemisphäre verwendet. Dazu wurde die zu schneidende Hemisphäre in Tissue-Tek Kleber eingebettet und bei konstant -27 °C in 30 µm dicke Koronarschnitte geschnitten. Die Hemisphäre wurde dabei nacheinander auf insgesamt 10 durchnummerierte Probenbehälter verteilt. Der Inhalt eines Probenbehälters wurde mit 5 °C kaltem 0,01 M PBS versetzt; die übrigen Behälter wurden für weitere Verwendungszwecke bei -80 °C gelagert. Nach circa 5 Minuten war der Kleber vollständig gelöst und die Schnitte konnten vorsichtig auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen werden. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 24 Stunden bei 37 °C wurden die Präparate mit Kresylviolett gefärbt (Absatz 2.3.4.1).

2.3.2.2 Anfertigung der Hirnschnitte am Mikrotom

Nach der Präparation des Gehirns wurde die linke Hemisphäre zur Fixierung in eine Einbettkassette gelegt und für mindestens 72 Stunden in einer 4%igen PFA-Lösung (Histofix) bei 4 °C gelagert. Nach der Fixierung wurden die Hirne in den TP Automatic Tissue Processor gegeben. Dort wurde folgendes Dehydrationsprotokoll verwendet: 5 Minuten in 4% Histofix; 30 Minuten in Leitungswasser; 1 Stunde in 50%, 60%, 70%, 80%, 90% Ethanol, 2 x 1 Stunde in 100% Ethanol; 1 Stunde in Xylol und 2 x 1 Stunde in geschmolzenem Paraffin. Danach wurden die Proben mithilfe der EG1140 H Embedding Station in Paraffinblöcke eingebettet. Anschließend wurden mit dem HM335E Mikrotom 4 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem ddH₂O-Wasserbad bei Raumtemperatur auf Superfrost® Objektträger aufgezogen und in einem zweiten Wasserbad bei ca. 55 °C entfaltet. Nach einer ca. 30minütigen Trocknungszeit bei Raumtemperatur wurden die Präparate für eine Nacht bei 37 °C gelagert und waren dann schließlich für die weitere immunhistochemische Bearbeitung vorbereitet (Absatz 2.3.3).

2.3.3 Immunhistochemie

2.3.3.1 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung

Zur DAB-Immunfärbung wurden die in Absatz 2.3.2.2 angefertigten 4 µm dicken, in Paraffin eingebetteten Sagittalschnitte zunächst für 2 x 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend rehydriert [10 Minuten in 100% Ethanol; 5 Minuten in 95% EtOH; 5

Minuten in 70% EtOH; 1 Minute in ddH₂O]. Danach wurden die Schnitte zur Hemmung endogener Peroxidasen für 30 Minuten in einer Lösung aus 200 ml 0,01M PBS und 2 ml 30% H₂O₂ inkubiert. Das Antigen-Retrieval (Antigendemaskierung) erfolgte durch Kochen der Schnitte in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0) für 10 Minuten in der Mikrowelle (2 Minuten bei 800 W; 8 Minuten bei 80 W) und einer darauffolgenden Abkühlungszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden die Schnitte für 1 Minute in ddH₂O getaucht, für 15 Minuten in 0,01 M PBS + 0,1 % Triton permeabilisiert und 1 Minute in 0,01 M PBS gewaschen. Zur Demaskierung des intrazellulären Abeta wurden die Schnitte für 3 Minuten in 88%iger Ameisensäure inkubiert und anschließend für 1 Minute in 0,01 M PBS gewaschen. Es folgten 2 weitere Waschschrte à 5 Minuten in jeweils frischem 0,01 M PBS. Um nicht-spezifische Bindestellen zu hemmen, wurden die Schnitte nach den Waschschrten für 1 Stunde in einer Suspension auf Basis von 0,01 M PBS mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 4% Milchpulver unter Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die primären Antikörper (Tabelle 4) zur gewünschten Konzentration mit 0,01 M PBS und 10% FCS verdünnt und mit je 100 µl/Schnitt der primären Antikörperverdünung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden drei Waschschrte à 5 Minuten mit 0,01 M PBS + 0,1% Triton und anschließendem 1minütigem Waschen in 0,01 M PBS durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in einer Lösung mit den entsprechenden sekundären biotinylierten Antikörpern (Tabelle 5) auf Basis von 0,01 M PBS und 10% FCS für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Circa 30 Minuten vor Ablauf der Inkubation wurde mithilfe des VECTASTAIN Elite ABC-Kits eine Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Lösung nach Herstellerangaben hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in 0,01 M PBS gewaschen und schließlich mit 100 µl/Schnitt der ABC-Lösung für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachdem die ABC-Lösung durch dreimaliges Waschen à 5 Minuten mit 0,01 M PBS entfernt worden war, konnten die Schnitte mit dem DAB-Farbstoff angefärbt werden. Dazu wurde mithilfe des DAB-Peroxidase (HRP)-Substrate-Kit SK4100 nach den Herstellerangaben eine DAB-Färbelösung angesetzt und die Schnitte mit dieser bis zur gewünschten Färbintensität inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in 0,01 M PBS gewaschen und gegengefärbt [40 Sekunden in gefiltertes Hämatoxylin; kurzes Eintauchen in ddH₂O; 5 Minuten unter laufendem Leitungswasser ausgespült]. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe [1 Minute in 70% EtOH; 5 Minuten in 95% EtOH; 10 Minuten in 100% EtOH; 2 x 5 Minuten in Xylol] dehydriert und mit 2-3 Tropfen Roti®-Histokit und einem Deckgläschen eingedeckt.

2.3.3.2 Immunhistochemische Fluoreszenz-Färbung

Zur immunhistochemischen Fluoreszenz-Färbung wurden 4 µm dicke, in Paraffin eingebettete Sagittalschnitte (Absatz 2.3.2.2) verwendet. Diese wurden jeweils 2 x 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe [10

Minuten in 100% Ethanol (EtOH), 5 Minuten in 95% EtOH, 5 Minuten in 70% EtOH, 1 Minute in ddH₂O] rehydriert. Das Antigen-Retrieval (Antigendemaskierung) erfolgte durch Kochen der Schnitte in 10 mM Zitratpuffer (pH6) für 10 Minuten in der Mikrowelle (2 Minuten bei 800 W, 8 Minuten bei 80 W) mit anschließender 15-minütiger Abkühlungszeit bei Raumtemperatur. Nach 1 Minute in ddH₂O wurden die Schnitte für 15 Minuten in 0,01 M PBS + 0,1 % Triton permeabilisiert und für eine weitere Minute in 0,01 M PBS gewaschen. Durch eine 3minütige Inkubation in 88% Ameisensäure wurde das intrazelluläre Abeta demaskiert. Anschließend wurden die Schnitte für 1 Minute in 0,01 M PBS gewaschen. Nicht-spezifische Bindestellen wurden mithilfe einer Suspension bestehend aus 0,01 M PBS Trägerlösung mit 10% fetalem Kälberserum und 4% Milchpulver gehemmt. Dazu wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Lipidstift umkreist und in 100 µl/ Schnitt obiger Suspension für 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die primären Antikörper (Tabelle 4) zu gewünschter Konzentration in 0,01 M PBS und 10 % fetalem Kälberserum verdünnt und davon je 100 µl/ Schnitt über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte für 3 x 5 Minuten in 0,01 M PBS + 0,1 % Triton gewaschen und für 1 Minute in frisches 0,01 M PBS getaucht. Es wurde eine Verdünnung von 1:200 für die sekundär-fluoreszierenden Antikörper (Tabelle 5) mit 0,01 M PBS und 10% FCS angesetzt. Die Schnitte wurden dann für 1,5 Stunden bei 37 °C vor Licht geschützt mit 100 µl/ Schnitt dieser Verdünnung inkubiert und anschließend für 3 x 5 Minuten in 0,01 M PBS unter einer lichtundurchlässigen Styroporbox gewaschen. In einem letzten Schritt wurde mithilfe von in Xylol getränkten Wattestäbchen der Lipidwall entfernt und die Schnitte mit je 2-3 Tropfen eines 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthaltenden Einbettmediums mit Menzel-Deckgläschen eingedeckt. Die Präparate wurden in lichtundurchlässiger Aluminiumfolie bei 5 °C gelagert.

Die Analyse der Präparate erfolgte mithilfe des Fluoreszenzmikroskops EVOS[®] FL Color. Mit der Software ImageJ wurden die Bilder aufbereitet.

2.3.3.3 Immunhistochemie nach der Free-Floating-Methode

Für die immunhistochemische Färbung nach der Free-Floating-Methode wurden gefrorene, 30 µm dicke Koronarschnitte verwendet (Absatz 2.3.2.1). Dazu wurden die Schnitte vorsichtig in eine 12-Loch-Probenplatte gegeben und zunächst 5 Minuten in 0,01 M PBS gewaschen und anschließend weitere 10 Minuten in frischem 0,01 M PBS rehydriert. Zur Hemmung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte in 0,3%igem Wasserstoffperoxid für 30 Minuten inkubiert und anschließend 3 x 10 Minuten in 0,01 M PBS + 0,1% Triton permeabilisiert. Es folgte ein 1minütiger Waschschriff in 0,01 M PBS. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation für 1 Stunde mithilfe einer Suspension aus 0,01 M PBS, 10% FCS und 4% Milchpulver gehemmt. Danach folgte die

Inkubation in einer Verdünnung des primären Antikörpers mit gewünschter Konzentration (Tabelle 4) bestehend aus 0,01 M PBS und 10% FCS.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst 3 x 10 Minuten in 0,01 M PBS + 0,1% Triton gewaschen und anschließend für eine weitere Minute in 0,01 M PBS getaucht. Es wurde eine Verdünnung des sekundären Antikörpers in einer Konzentration von 1:250 mit 0,01 M PBS und 10% FCS hergestellt (Tabelle 5) und die Schnitte für 2 Stunden bei Raumtemperatur darin inkubiert. Circa 30 Minuten vor Ablauf der Inkubation wurde mithilfe des VECTASTAIN Elite ABC-Kits eine Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Lösung nach Herstellerangaben hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Nach Waschen der Schnitte für 3 x 10 Minuten in frischem 0,01 M PBS wurden diese in der zuvor angesetzten Avidin-Biotin-Complex-Lösung für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut für 3 x 10 Minuten in 0,01 M PBS gewaschen und schließlich mittels DAB-Farbstoff entwickelt. Dazu wurde mithilfe des DAB-Peroxidase (HRP)-Substrate-Kit SK4100 nach den Herstellerangaben eine DAB-Färbelösung angesetzt und die Schnitte mit dieser bis zur gewünschten Färbeintensität inkubiert. Nachdem die Schnitte 3 x 10 Minuten in 0,01 M PBS gewaschen wurden, wurden sie auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin [Rehydrierung für 10 Minuten in 0,01 M PBS; 40 Sekunden in gefiltertes Hämatoxylin; kurz in ddH₂O eingetaucht; 5 Minuten in laufendem Leitungswasser ausgespült]. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe [1 Minute in 70% EtOH; 5 Minuten in 95% EtOH; 10 Minuten in 100% EtOH; 2 x 5 Minuten in Xylol]. Die dehydrierten Schnitte wurden anschließend mit 2-3 Tropfen Roti®-Histokit und einem Menzel-Deckgläschen eingedeckt.

2.3.4 Kresylviolett-Färbung und Quantifizierung der Neuronenzahl

Eine quantitative Analyse der Neuronenzahl wurde in den Hirnregionen CA1 des Hippocampus (Absatz 3.3.1 und Absatz 3.5), Striatum (Absatz 3.3.2) und piriformer Kortex (Absatz 3.3.3) mithilfe der Design-basierten Stereologie durchgeführt. Durch die Design-basierte Stereologie konnten reliable Ergebnisse für jede Hirnregion erzielt werden, da sie unabhängig von Größe, Form, räumlicher Orientierung und Verteilung der Zellen in der zu untersuchenden Region durchgeführt werden konnte (Schnitz und Hof 2005).

2.3.4.1 Kresylviolett-Färbung

Die Kresylviolett-Färbung zählt zu den Nissl-Färbungen und dient der Darstellung von neuronalem Gewebe. Dabei werden hauptsächlich die sauren Bestandteile des Neurons wie bspw. DNA und RNA angefärbt (Lexikon der Neurowissenschaft 2018). Zur Kresylviolett-Färbung wurden die in Absatz 2.3.2.1 angefertigten Schnitte verwendet.

1. Tag: Vorbereitung der Puffer- und Färbelösungen:

Zunächst wurden am Tag vor der Färbung folgende Pufferlösungen (1A und 1B) angesetzt:

- **1 A:** In 100 ml Reinstwasser wurden 13,61 g Natriumacetat-Trihydrat gelöst.
- **1 B:** 40 ml der Pufferlösung 1 A wurden zusammen mit 9,6 ml 100%iger Essigsäure unter dem Abzug auf 1000 ml Reinstwasser aufgefüllt.

Zusätzlich wurde am selben Tag die Färbelösung **2** mit dem Farbstoff Kresylviolett vorbereitet. Dazu wurden 0,1 g Kresylviolett in einem Liter der Pufferlösung 1B - lichtgeschützt durch Aluminiumfolie - unter ständigem Rühren mit dem Magnetrührer über Nacht vollständig gelöst.

2. Tag: Färbung der Schnitte mit Kresylviolett:

Am darauffolgenden Tag wurde die Arbeitslösungen zur Delipidierung (3B) der Schnitte frisch angesetzt:

- **3 A:** 2 ml Triton X-100 wurden mit 9,8 ml Reinstwasser unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer für 1 Stunde gelöst, bis keine sichtbaren „Schlieren“ mehr erkennbar waren.
- **3 B:** 2,5 ml der Lösung 3A wurden mit 50 ml Reinstwasser und 150 ml 100 % Ethanol versetzt.

Zur Delipidierung wurden die Schnitte zunächst 2 x 10 Minuten in Pufferlösung 1B getaucht; anschließend 20 Minuten in 3B und weitere 2 x 10 Minuten in Pufferlösung 1B. Die Färbung mit Kresylviolett erfolgte lichtgeschützt unter einer Styroporbox durch Inkubation für 2 x 8 Minuten in gefilterter Färbelösung **2**. Die Dehydrierung der Schnitte wurde wie folgt durchgeführt: 3 x 1 Minute in Pufferlösung 1B; 3 Minuten in 100% Ethanol; 10 Minuten in Isopropanol; 2 x 5 Minuten in Xylol. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit 2-3 Tropfen Roti®-Histokit und einem Deckgläschen eindeckt. Nach Trocknung über Nacht unter dem Laborabzug waren die Präparate für die stereologische Analyse nutzbar.

2.3.4.2 Design-basierte Stereologie

Eine stereologische Untersuchung der Neuronenzahl wurde an 30 µm dicken, Kresylviolett gefärbten (Absatz 2.3.4.1) Koronarschnitten von Tg4-42, TBA42 und bigenen Mäusen durchgeführt. Es wurden die Hirnregionen Striatum, piriformer Kortex und CA1-Region des Hippocampus untersucht. Dazu wurde ein Olympus BX51-Mikroskop verwendet, welches mit einem motorisierten Probenstisch ausgestattet war. Mithilfe eines Joysticks konnte der Probenstisch präzise gesteuert und mit der Software Stereo Investigator 7 eine unabhängige Analyse der Präparate im *optical fractionator work flow* durchgeführt werden (West et al. 1991). Dabei wurde die Hirnregion zunächst mithilfe des *single click mode* in 4-facher Vergrößerung eingerahmt. Über das umrandete Areal wurde ein *sampling grid* mit einer für die Hirnregion spezifischen Maschenweite gelegt. Mit den Schnittpunkten der Linien des *sampling grid* wurden durch das Computerprogramm randomisiert *counting frames*

(Zählrahmen) erzeugt. Die Zählrahmen definierten dabei die Grenzen des zu zählenden Abschnitts und wurden durch die *optical disector height* von 5 μm zu einem dreidimensionalen Raum ergänzt. Die *top guard zone* betrug 2 μm (West et al. 1991; Schmitz und Hof 2005). Die Schnittdicke wurde für jeden Zählrahmen neu bestimmt. Nach fest definierten Zählregeln wurden sukzessive die Zählrahmen ausgewertet (West 2002).

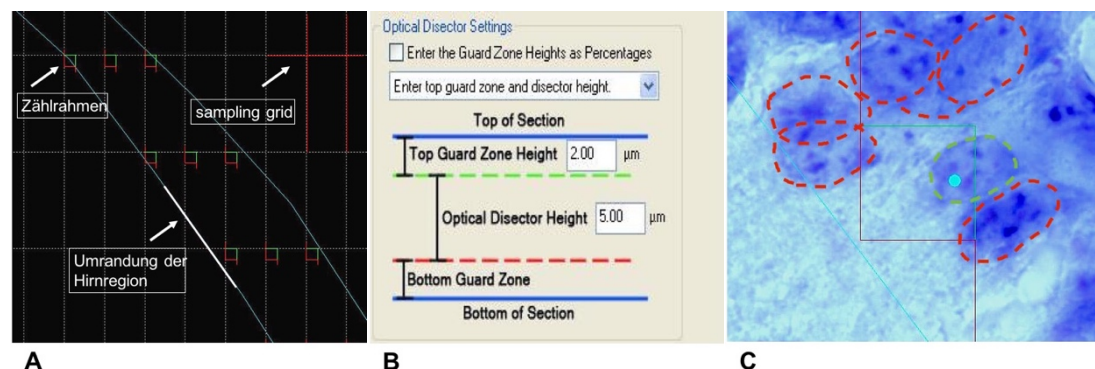


Abbildung 4: Grundprinzip und Regeln der Stereologie. Nachdem die zu untersuchende Hirnregion umrandet worden war, erfolgte im nächsten Schritt (A) die Einstellung der für jedes Areal spezifischen Parameter (Tabelle 8) für den Zählrahmen und das *sampling grid*. Danach wurde dem Zählrahmen durch die Einstellung *optical disector height* (B) eine Tiefe von 5 μm zugeordnet, was bedeutet, dass Zellen, die in einem Raum von 14 μm x 14 μm x 5 μm liegen, in die stereologische Analyse einfließen. Für jeden Zählrahmen wurden dabei *top of section* und *bottom of section* erneut gemessen. (C) Randomisiert wurden nun durch die Software entlang des *sampling grid* die Zählrahmen erzeugt, und es konnte nach folgenden fest definierten Regeln gezählt werden. Alle Zellen innerhalb oder die grünen Linien des Zählrahmens schneidend/ berührend wurden gezählt (grüne gestrichelt-umrandete Zelle). Nicht gezählt wurden Zellen, die außerhalb des Zählrahmens lagen oder die roten Linien des Zählrahmens schnitten/ berührten (rote umrandete Zellen). Der türkisfarbene Punkt markiert eine gezählte Zelle.

Zur Berechnung der Neuronenzahl wurden die Formeln (1), (2) und (3) verwendet (Schmitz und Hof 2005). Die Zählregeln sind in Abbildung 4 erläutert. Die Parameter zu den untersuchten Hirnregionen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

$$(1) \quad P = asf \times sfsf \times tsf$$

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

$$(3) \quad N_{\text{gesamt}} = \sum_{k=1}^n N_{\text{Schnitt } k}$$

Tabelle 7: Legende und allgemeine Formeln zur Berechnung der Neuronenzahl

<i>Legende zu den Formeln (1), (2) und (3)</i>		<i>Berechnung</i>
<i>asf</i>	Area Sampling Fraction	Sampling Grid Area (XY)/Counting Frame Area XY
<i>ssf</i>	Section Sampling Fraction	Jeder 10. Schnitt
<i>tsf</i>	ThicknessSampling Fraction	Number Weighted Mean Section Thickness/ Z
<i>P</i>	Zwischenwert	s. (1)
<i>Q</i>	Total Markers Counted	
<i>Z</i>	Disector Height	

Die stereologische Auswertung der CA1-Region des Hippocampus wurde bei allen untersuchten Mäusen in einem Bregma-Bereich von -1,22 mm bis -3,80 mm, im Striatum von Bregma +1,42 mm bis -2,10 mm und im piriformen Kortex von Bregma +1,70 mm bis -1,46 mm durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte in unabhängigen t-Test-Analysen und einfachen Varianzanalysen (one-way ANOVA) in Bonferroni-korrigierter Form.

Tabelle 8: Parameter zur Stereologie der analysierten Hirnregionen

<i>Parameter</i>	<i>CA1</i>	<i>Striatum</i>	<i>Piriformer Kortex</i>
<i>Counting Frame Area (XY) (μm^2)</i>	196	196	400
<i>Counting Frame Width (X) (μm)</i>	14	14	20
<i>Counting Frame Width (Y) (μm)</i>	14	14	20
<i>Disector Height (Z) (μm)</i>	5	5	5
<i>Sampling Grid Area (XY) (μm^2)</i>	5250	65508	7905
<i>Sampling Grid (X) (μm)</i>	50	309	93
<i>Sampling Grid (Y) (μm)</i>	105	212	85
<i>asf</i>	26,79	334,22	19,76
<i>ssf</i>	10	10	10

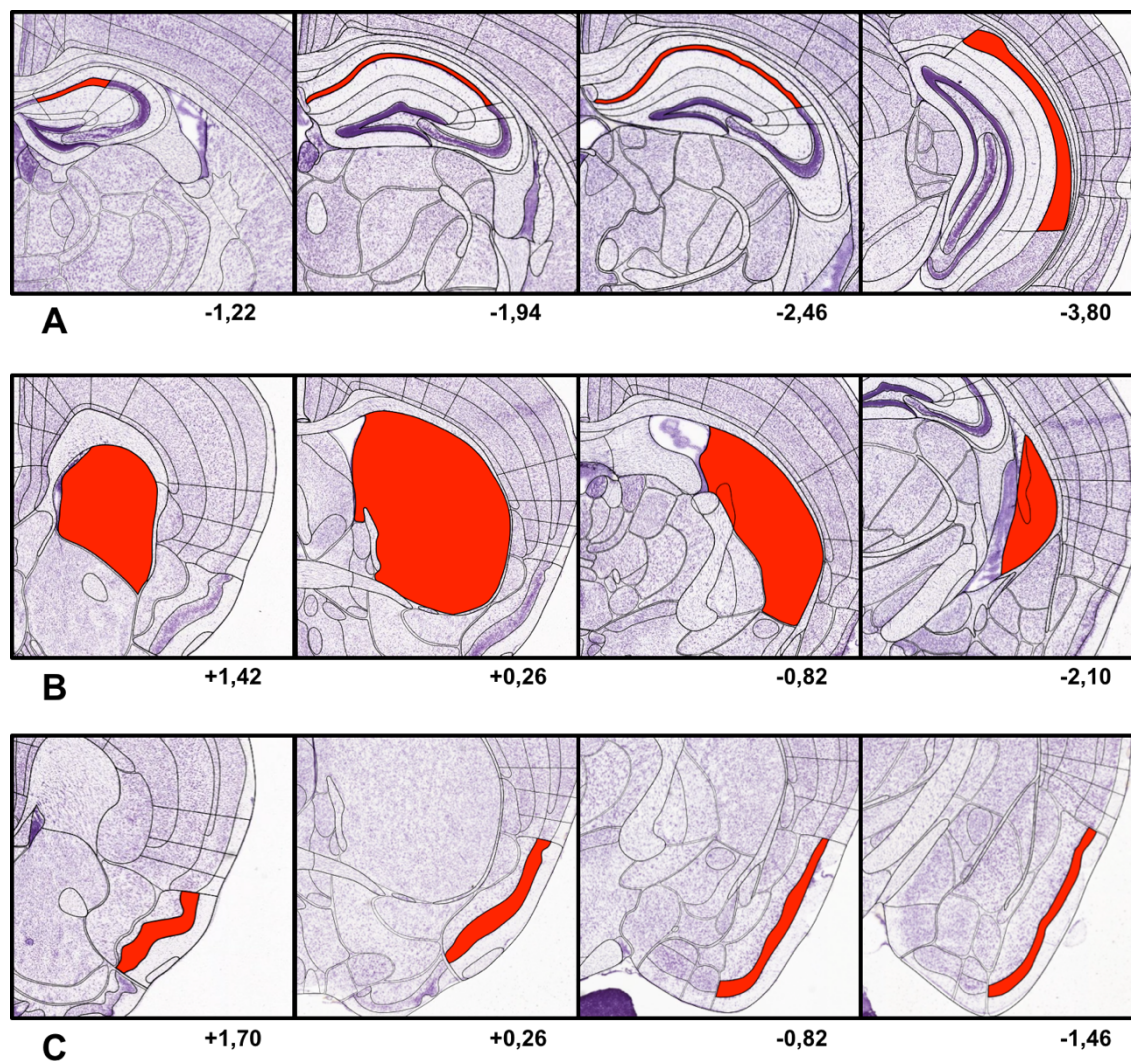


Abbildung 5: Übersicht Hirnregionen. Mithilfe der Design-basierten Stereologie wurden folgende Hirnregionen ausgewertet (rot unterlegt): (A) CA1-Region des Hippocampus, (B) Striatum und (C) piriformer Kortex. Die ausgewählten Bregmata dienen der exemplarischen Darstellung; Maßeinheit in [mm]. Die vorliegende Abbildung wurde mit Bildern des Allen Reference Mouse Brain Atlas © 2015 Allen Institute for Brain Science erstellt (Allen Institute 2015)

2.3.5 Quantifizierung der Mikrogliaaktivität in DAB-gefärbten Präparaten

Zur Bestimmung der Mikrogliaaktivität im Kortex-Areal wurden 4 μm dicke, DAB-gefärbte Sagittalschnitte verwendet (Absatz 2.3.3.1). In einem Abstand von ca. 20-32 μm eines Hirns wurden insgesamt drei Schnitte ausgewählt. Es wurden pro Gruppe neun Tiere in die Auswertung einbezogen. Unter Verwendung des primären Antikörpers IBA-1 mit einer Verdünnung von 1:1000 und einer DAB-Einwirkzeit von 3 Minuten konnten so die Mikrogliazellen im Kortex dargestellt werden. Im Anschluss an die Immunfärbung wurden alle Schnitte unter gleichen Belichtungsbedingungen unter 20-facher Vergrößerung mithilfe eines Olympus BX-51 Mikroskops, ausgestattet mit einer Moticam Pro 282A-Kamera, nach folgendem vorher festgelegten Schema fotografiert:

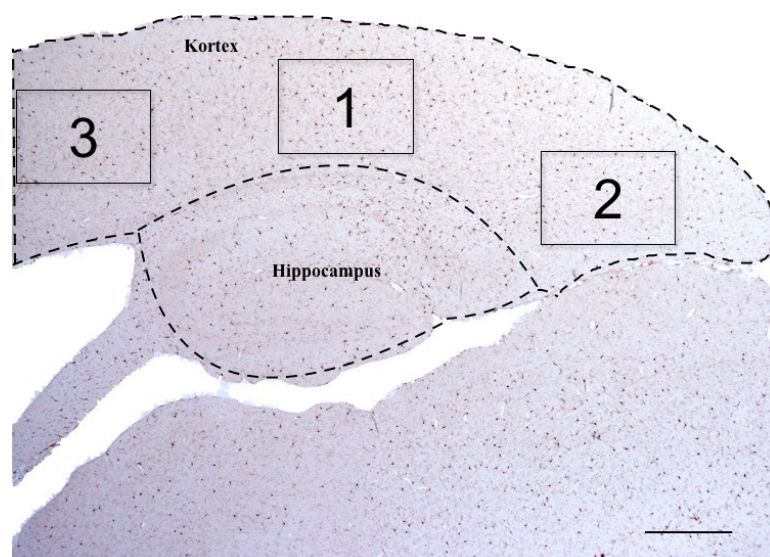


Abbildung 6: Schema der Auswertung des Kortex-Areal. Als Leitstruktur zur Auswahl der Schnitte wurde der Hippocampus herangezogen. Region 1 sollte direkt über dem Hippocampus im Bereich der Somatosensorik liegen. Für Region 2 wurden die visuellen Areale und für Region 3 die somatomotorischen Areale des Kortex festgelegt. In dieser Reihenfolge wurden schließlich die Aufnahmen gemacht und mithilfe der Software ImageJ ausgewertet. Maßstab 500 μm

Der Kortex wurde in drei Regionen aufgeteilt, von welcher je ein Bild pro Schnitt aufgenommen wurde. So entstanden für jedes Tier neun Aufnahmen (drei Schnitt; drei Regionen mit jeweils drei Bildern). Die Bilder wurden in ImageJ in ein binäres 8-Bit Schwarz-Weiß-Bild konvertiert und im Anschluss mit einem Schwellenwert von 110 durch ImageJ ausgewertet. Die Werte jeder Region wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst (drei Werte pro Tier) und in einer unabhängigen t-Test Analyse mit Prism GraphPad ausgewertet.

Es sei anzumerken, dass aufgrund der Inhomogenität der Färbeintensitäten innerhalb der Gruppe der Wildtyp-Tiere eine Korrektur der Werte mithilfe eines Korrekturfaktors notwendig war. Einige Wildtyp-Tiere, welche alle aus einer Zuchtgruppe stammten, zeigten aus nicht klärbaren Gründen ein deutlich erhöhtes Hintergrundrauschen im Schritt der DAB-Entwicklung. Somit wurden durch die Auswertung mit ImageJ bei gleichem Schwellenwert deutlich höhere Schwarzwerte erreicht. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurde ein Korrekturfaktor zwischen den Mittelwerten der „Wildtyp-Tiere Schwarzwert \uparrow “ / „Wildtyp-Tiere Schwarzwert \downarrow “ errechnet. So konnte die Gruppe der Wildtyp-Tiere in sich angeglichen werden, und eine weitere Analyse der Daten war problemlos möglich.

Alle Ergebnisse wurden auf die Gruppe der Wildtyp-Tiere normalisiert und sind in Absatz 3.4 dargestellt.

2.3.6 Statistik

Die Auswertung aller Daten erfolgte mit der Software Prism GraphPad 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Dabei wurden die Gruppen sowohl mit unabhängigen t-Test-Analysen als auch mit einfacher Varianzanalyse (*one-way* ANOVA) in Bonferroni-korrigierter Form ausgewertet.

Unter der jeweiligen Abbildung sind die Signifikanzniveaus wie folgt angegeben: ****p < 0,0001; ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05. Ebenso wurden auch die Gruppengrößen mit Kennzeichnung (n) unter der jeweiligen Abbildung vermerkt. Alle Angaben sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) dargestellt.

2.3.7 Software

Tabelle 9: Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
<i>GraphPad Prism 5</i>	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
<i>ImageJ 1.47f</i>	National Institutes of Health, Bethesda, USA
<i>Image Studio Version 3.1</i>	LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA
<i>Microsoft Office 2017</i>	Microsoft, Redmond, WA, USA
<i>Motic Images ver.2.0</i>	Motic Asia, Kowloon, Hong Kong, CHN
<i>Stereo Investigator</i>	MicroBrightField Bioscience, Williston, USA

3 Ergebnisse

3.1 Bestätigung der verwendeten Mausmodelle

Folgende Mausmodelle fanden in dieser Arbeit Verwendung: Tg4-42 (Bouter et al. 2013), TBA42 (Wittnam et al. 2012), Bigen (Lopez-Noguerola et al. 2018) und eine Gruppe mit Wildtyp-Tieren zur Kontrolle. Die verwendeten Hirnproben wurden durch autorisierte Mitarbeiter der Arbeitsgruppe entnommen. Zur Unterscheidung der Wildtyp-Kontrollen von den transgenen Tieren wurde eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt.

Da die Bandengrößen in der gelelektrophoretischen Auswertung bei den transgenen Tieren gleichauf erwartet wurden, erfolgte die weitere Unterscheidung der verwendeten Mausmodelle TBA42, Tg4-42 und Bigen im nächsten Schritt mittels spezifischer Immunfluoreszenzfärbungen. So konnten die für das jeweilige Mausmodell spezifischen Aß-Peptide dargestellt werden (siehe dazu 3.1.2).

3.1.1 Unterscheidung der Transgene vom Wildtyp mittels Gelelektrophorese

Abbildung 7 zeigt die gelelektrophoretische Auswertung. Wildtyp-Tiere (WT und P WT) wurden ohne Bande erwartet. Als Positiv-Kontrollen wurden ein TBA42-transgenes Tier, ein Tg4-42-transgenes Tier und ein Wildtyp (P WT) verwendet. Ebenfalls wurde eine Negativkontrolle aufgetragen. Sowohl TBA42 als auch Tg4-42 wurden mit der gleichen Bandengröße in einem Bereich von 248bp erwartet.

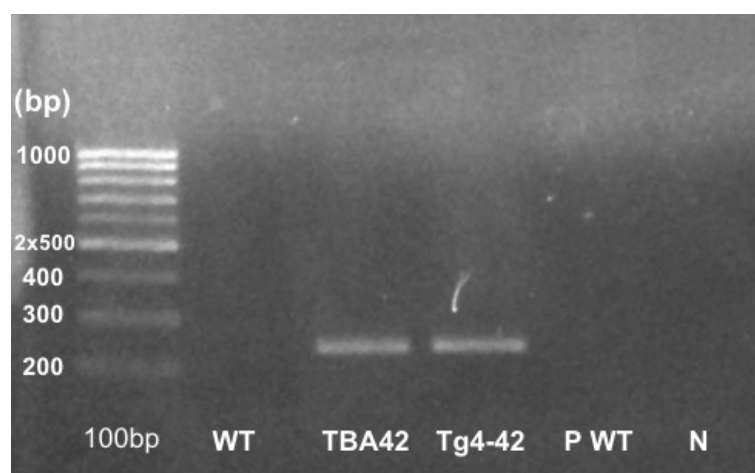


Abbildung 7: Exemplarische Gelelektrophorese. Keine Banden bei dem zu untersuchenden Wildtyp (WT, P WT). Sowohl TBA42 als auch Tg4-42 zeigen eine für ihre DNA-Sequenz typische Bande bei ca. 248bp.

3.1.2 Darstellung der verschiedenen A β -Peptide zur Bestätigung der verwendeten Mausmodelle

Zur weiteren Unterscheidung der Mausmodelle Tg4-42, TBA42 und Bigen wurde mittels spezifischer Immunhistochemie die Expression verschiedener A β -Peptide dargestellt. Somit konnte eine sichere Bestätigung der Mausmodelle erfolgen.

Dazu wurde für jedes Modell eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung durchgeführt. Allen Färbereien gemeinsam war die optische Darstellung der A β -Peptide mithilfe des Pan-Abeta-Markers Solanezumab_{BS} und einem sekundär-fluoreszierenden Antikörper mit der Wellenlänge von 594 nm (rot) in der Fluoreszenzmikroskopie. Des Weiteren wurde bei allen Ansätzen der A β _{pE3-42} spezifische Antikörper 1-57 mit dazugehörigem sekundär-fluoreszierenden Antikörper mit der Wellenlänge 488 nm (grün) in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Tabelle 10 zeigt das für jedes Mausmodell spezifische Fluoreszenzmuster:

Tabelle 10: Spezifische Verteilungsmuster der A β -Varianten in den untersuchten Mausmodellen

<i>Mausmodell</i>	<i>Aβ-Variante</i>	<i>Signal Pan-Abeta</i>	<i>Signal Aβ_{pE3-42}</i>
<i>Tg4-42</i>	A β ₄₋₄₂	ja	nein
<i>TBA42</i>	A β _{pE3-42}	ja	ja
<i>Bigen</i>	A β ₄₋₄₂ + A β _{pE3-42}	ja	ja (ca. doppelt so viel)

Das Tg4-42-Mausmodell ist durch die Expression der A β -Variante A β ₄₋₄₂ charakterisiert (Bouter et al. 2013). Da kein Signal für A β _{pE3-42} zu erkennen war, sind die bei der Pan-Abeta-Färbung entstandenen Signale auf das Vorhandensein von A β ₄₋₄₂ zurückzuführen.

Das TBA42-Mausmodell ist hauptsächlich durch die Expression der A β -Variante A β _{pE3-42} charakterisiert (Wittnam et al. 2012). Alle vorhandenen Signale für A β _{pE3-42} korrelierten in etwa 1:1 mit den Signalen der Pan-Abeta-Färbung. Somit erfolgte ein sicherer Nachweis des exprimierten Peptids.

Das Bigen-Mausmodell ist durch die Expression beider A β -Varianten in etwa gleichem Verhältnis charakterisiert (Lopez-Noguerola et al. 2018). Alle Signale, die in der Pan-Abeta-Färbung zusätzlich zu den A β _{pE3-42}-Signalen zu erkennen waren, sind also auf die Expression von A β ₄₋₄₂ zurückzuführen. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Fluoreszenz-Immunhistochemie dargestellt.

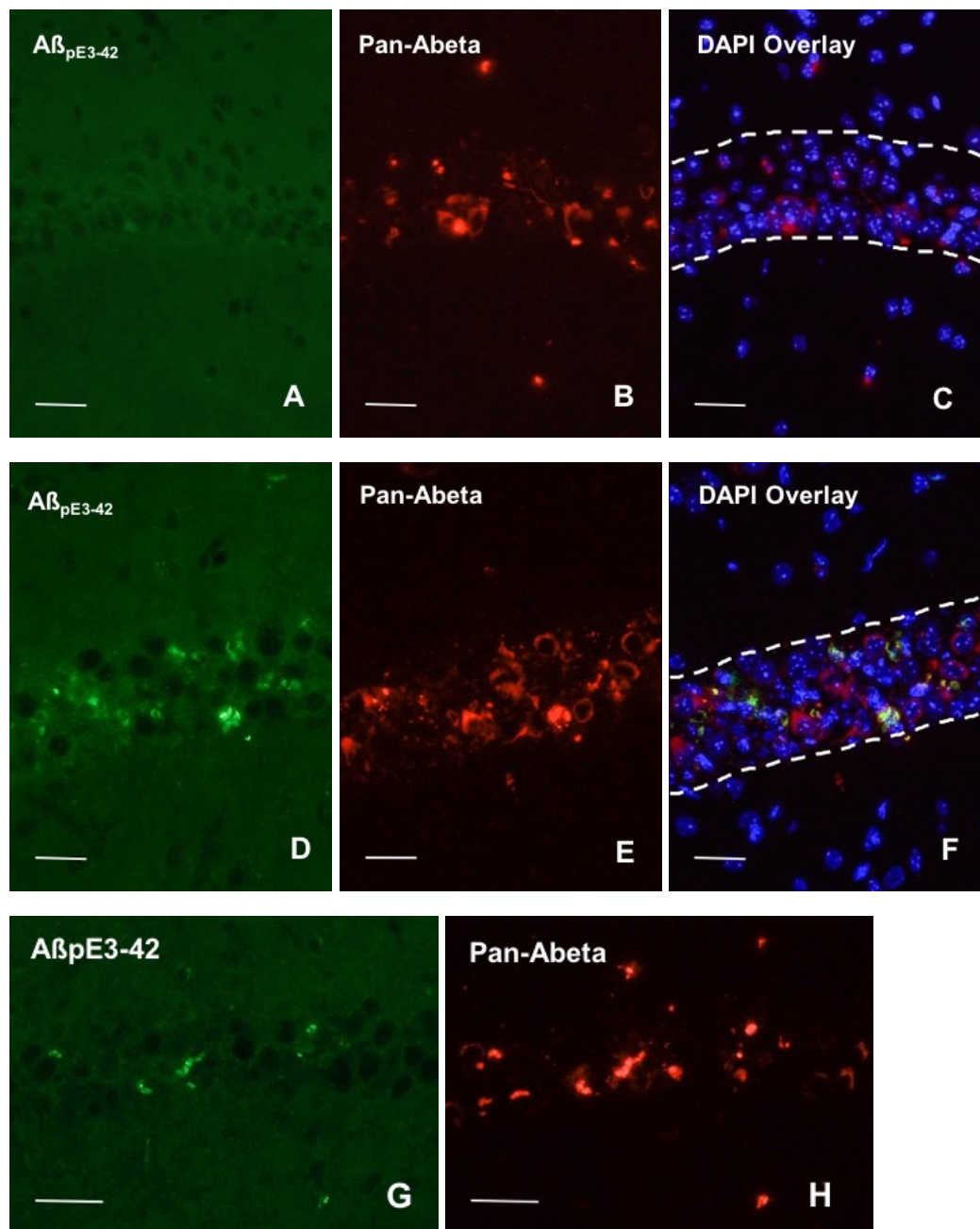


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbungen zu den in der Arbeit verwendeten Mausmodellen. (A-C) Färbereihe für das Tg4-42-Mausmodell. Es sind keine Signale bei $A\beta_{pE3-42}$ (Antikörper 1-57, grün) erkennbar. Es handelt sich ausschließlich um $A\beta_{4-42}$ -Expression (Antikörper Solanezumab_{BS}, rot). (D-F) Färbereihe für das TBA42-Mausmodell. 1:1 Korrelation der angefärbten Peptide. Es handelt sich ausschließlich um $A\beta_{pE3-42}$ -Expression. (G-H) Färbereihe für das Bigen-Mausmodell. Expression von $A\beta_{pE3-42}$ und $A\beta_{4-42}$. Deutlich mehr Fluoreszenzsignale zeigt die Pan-Abeta-Färbung, welche auf die zusätzliche Expression von $A\beta_{4-42}$ zurückzuführen ist. (A-H) Maßstab 50 μm .

3.2 Amyloid-beta-Expression im Tg4-42-Mausmodell

3.2.1 A β -Expression in der CA1-Region des Hippocampus, Striatum und piriformer Kortex

Das Tg4-42-transgene Mausmodell ist durch die Expression von intraneuronalem Amyloid-beta 4-42 charakterisiert (Bouter et al. 2013). In der Free-Floating Färbung mit dem humanisierten Antikörper Solanezumab_{BS} und 3,3-Diaminobenzidin (DAB) als Farbstoff wurde die A β -Expression in 2 Monate alten Tg4-42_{hom} Mäusen untersucht. 3,3-Diaminobenzidin reicherte sich vor allem in Zellen der Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus, im Striatum und im piriformen Kortex an (Abbildung 9).

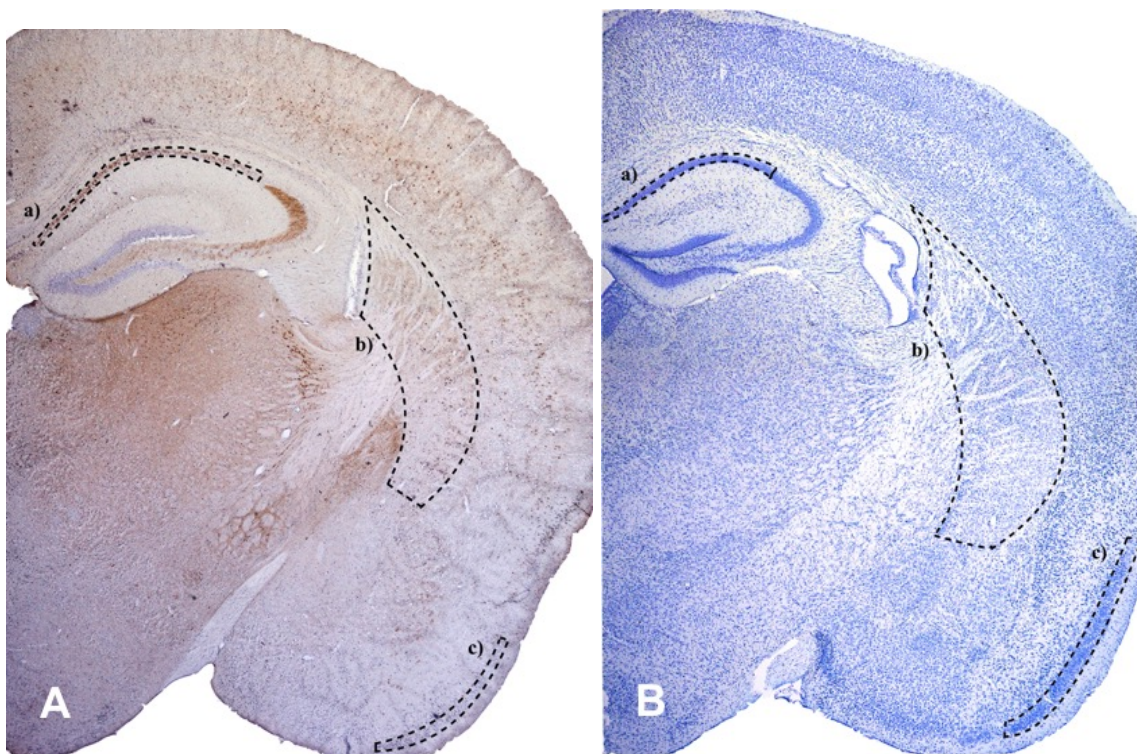


Abbildung 9: Koronarschnitte einer rechten Großhirnhälfte einer 2 Monate alten Tg4-42_{hom}-Maus. Intraneuronale A β -Expression konnte in folgenden Hirnarealen nachgewiesen werden: a) Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus b) Striatum und c) piriformer Kortex (Beschriftung für beide Bilder). (A) Übersicht über Hirnareale mit A β -Expression. DAB-Immunochemie mit Pan-Abeta-Antikörper Solanezumab_{BS}; Gegenfärbung mit Hämatoxylin. (B) Übersicht der im weiteren Verlauf der Arbeit analysierten Hirnareale mit spezifischer A β -Expression. Kresylviolett-Färbung zur Darstellung von Neuronen.

In striatalen Zellen ist eine eher diffuse A β -Expression zu beobachten. Die Anfärbung in diesem Hirnareal mit DAB ist weitaus schwächer ausgeprägt als beispielsweise in den Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus. Eine stärkere Aufnahme des Farbstoffs ist hingegen in den Zellen des piriformen Kortex zu sehen. In Abbildung 10 sind vergleichend in höherer Vergrößerung die Verteilungsmuster in den einzelnen Hirnarealen dargestellt. In allen Bereichen ist eine deutliche Verstärkung der Farbintensität

in den Randbereichen der Neurone zu erkennen, was für eine spezifische Anfärbung der A β -Peptide spricht.

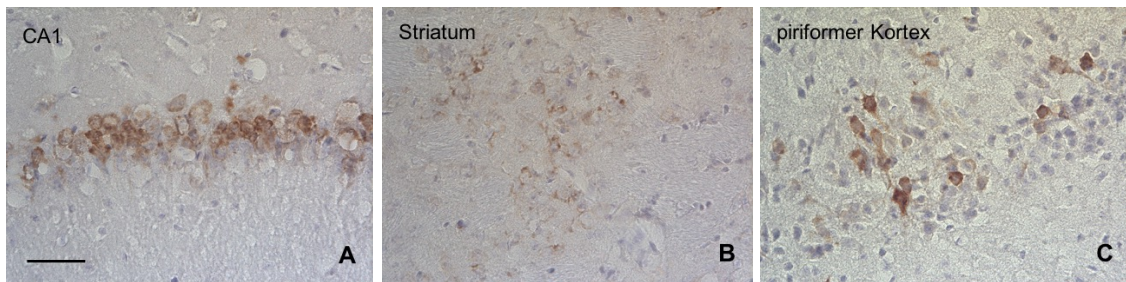


Abbildung 10: A β -Expression im Tg4-42-Mausmodell. Immunhistochemische Darstellung der Hirnareale mit spezifischer Amyloid-beta Expression. (A) Dicht gepackte Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus mit deutlicher DAB-Aufnahme. (B) Diffuses Verteilungsmuster der Farbstoff aufnehmenden Zellen im Hirnareal Striatum. (C) Piriformer Kortex mit teils kräftig angefärbten Neuronen; Gegenfärbung mit Hämatoxylin; Maßstab 33 μ m.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Areale, die A β -Expression zeigten, in einer Design-basierten Stereologie auf mögliche Veränderungen in der Neuronenzahl und des Volumens der jeweiligen Hirnregion untersucht.

3.3 Neuronenverlust im Tg4-42-Mausmodell

3.3.1 Signifikanter Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen

Das Tg4-42-Mausmodell wurde entwickelt, um die Auswirkungen einer chronischen Exposition mit dem N-terminal trunkeierten Peptid A β ₄₋₄₂ zu untersuchen. Zur quantitativen Analyse der Zellzahl wurden mit Kresylviolett gefärbte Präparate mit der Design-basierten Stereologie ausgewertet. Die Analyse der Pyramidenzellschicht der CA1-Region fand in einem Bregma-Bereich zwischen +1,22 mm bis -3,80 mm statt.

Es wurden die Zellzahlen von 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen und 6 Monate alten Wildtyp-Tieren verglichen. Die Analyse ergab einen signifikanten Neuronenverlust von 38% (Abbildung 11, unabhängiger t-Test; $p = 0,0029$) zwischen Tg4-42_{hom}-Mäusen (Mittelwert: $158246 \pm \text{SEM} \pm 7186$; $n = 5$) und Wildtyp-Tieren (Mittelwert: $253803 \pm \text{SEM} \pm 20581$; $n = 6$). Darüber hinaus wurde mithilfe der Cavalieri-Formel das Volumen der CA1-Region in beiden Gruppen untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Volumenabnahme von 26% (Abbildung 11; unabhängiger t-Test; $p = 0,0071$) bei den transgenen Tg4-42_{hom}-Mäusen (Mittelwert: $195557780 \pm \text{SEM} \pm 13892399$; $n = 5$) im Vergleich zur Gruppe der Wildtyp-Tiere (Mittelwert: $264823633 \pm \text{SEM} \pm 14081566$; $n = 6$).

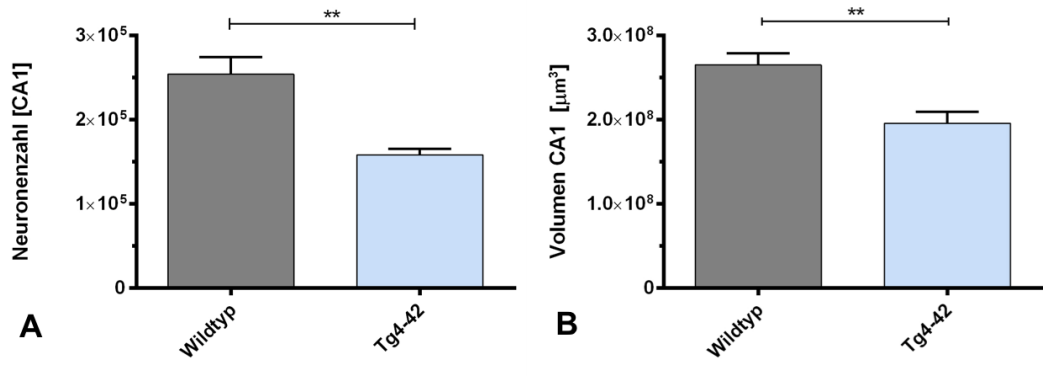


Abbildung 11: Neuronenverlust und Volumenabnahme in Tg4-42_{hom}-Mäusen. Im Alter von 6 Monaten zeigte sich in der Design-basierten stereologischen Analyse ein signifikanter (A) Verlust der Nervenzellzahl in der CA1-Region des Hippocampus von 38% und eine (B) Volumenabnahme von 26% im Vergleich zur Gruppe der Wildtyp-Tiere. Unabhängige t-Test-Analyse; WT n = 6; Tg4-42_{hom} n = 5; Alter beider Gruppen: 6 Monate; alle Daten angegeben in Mittelwert ± SEM. **p < 0,01.

3.3.2 Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal Striatum bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen

Im Hirnareal Striatum konnte in der immunhistochemischen Färbung eine Aβ-Expression beobachtet werden (Absatz 3.2.1). Es fand eine Analyse mittels Design-basierter Stereologie in einem Bregma-Bereich von +1,20 mm bis -2,10 mm statt. Diese ergab keinen signifikanten Neuronenverlust (unabhängiger t-Test; p = 0,0676) zwischen der Gruppe der Wildtyp-Tiere (Mittelwert: 3117071 ± SEM ± 58237, n = 6) und der Gruppe der Tg4-42_{hom}-Mäuse (Mittelwert: 2908532 ± SEM ± 80825, n = 7). Ebenso war die Abnahme des Volumens, welches mithilfe der Cavalieri-Formel ermittelt wurde mit einem p = 0,9047 in der unabhängigen t-Test-Analyse nicht signifikant (Angaben in Mittelwert ± SEM; WT: 9141720333 ± 197990138; Tg4-42: 9091465143 ± 338411397). Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

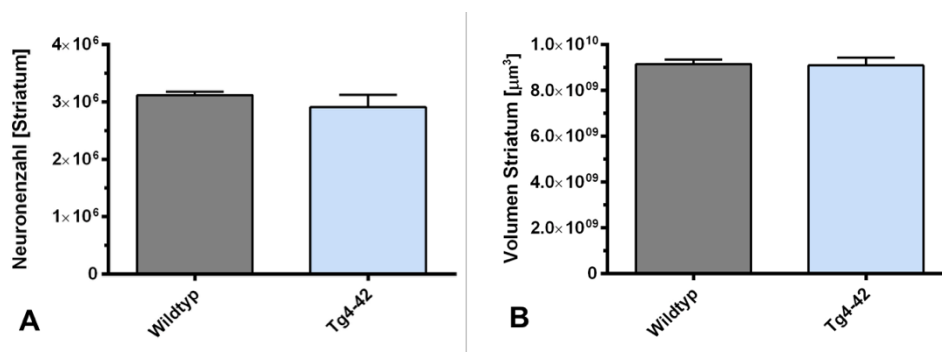


Abbildung 12: Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal Striatum. In der Design-basierten Stereologie konnte kein signifikanter Neuronenverlust (A) und kein Volumenunterschied (B) ermittelt werden. Unabhängige t-Test-Analyse; WT n = 6; Tg4-42_{hom} n = 7; Alter beider Gruppen: 6 Monate; alle Daten angegeben in Mittelwert ± SEM.

3.3.3 Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal piriformer Kortex bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen

Wie in Absatz 3.2.1 beschrieben, konnte auch im piriformen Kortex eine A β -Expression gezeigt werden. Mittels Design-basierter Stereologie wurde eine Analyse der Neuronenzahl in einem Bregma-Bereich zwischen +1,70 mm bis -1,46 mm bei Tg4-42_{hom}-Mäusen und der Gruppe der Wildtyp-Tiere durchgeführt (Abbildung 13). Die darauffolgende statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied (unabhängiger t-Test; $p = 0,6147$) zwischen den Zellzahlen der Wildtyp-Gruppe (Mittelwert: $302049 \pm \text{SEM} \pm 10776$; $n = 6$) und der Gruppe der Tg4-42-Mäuse (Mittelwert: $293870 \pm \text{SEM} \pm 11316$, $n = 7$). Eine Analyse der Volumina des piriformen Kortex beider Gruppen (Mittelwert Wildtyp: $671482217 \pm \text{SEM} 19963287$, $n = 6$; Mittelwert Tg4-42_{hom}: $657047629 \pm \text{SEM} \pm 30047001$, $n = 7$) ergab auch hier keinen signifikanten Unterschied (unabhängiger t-Test; $p = 0,7074$).

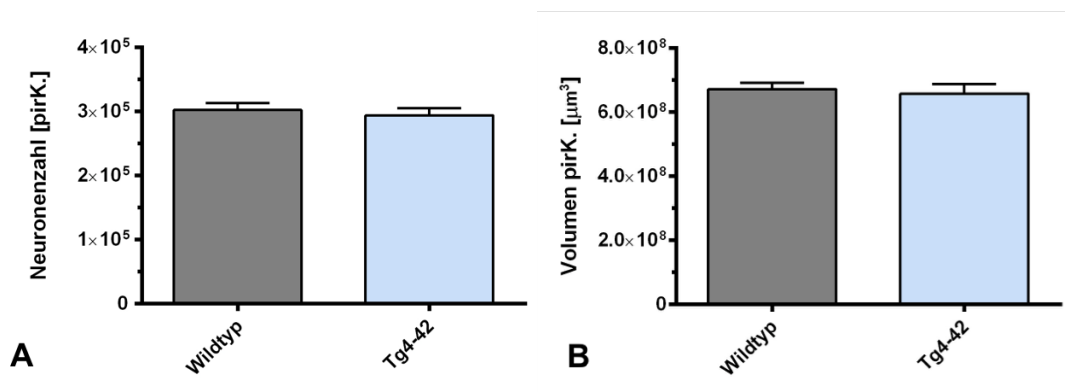


Abbildung 13: Kein signifikanter Neuronenverlust im Hirnareal piriformer Kortex. (A) In der Design-basierten Stereologie ist kein signifikanter Neuronenverlust ermittelt worden. (B) Auch die Volumenanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Unabhängige t-Test-Analyse; WT $n = 6$; Tg4-42_{hom} $n = 7$; Alter beider Gruppen: 6 Monate; alle Daten angegeben in Mittelwert \pm SEM.

3.4 Signifikante Verbesserung der Mikroglie durch passive Immunisierung mit dem Antikörper NT4X im Bereich des Kortex bei Tg4-42_{hom}-Mäusen

Ein wichtiger Faktor in der Alzheimer-Pathologie ist die neuroinflammatorische Reaktion. Diese spielt sich sowohl im Hippocampus als auch in anderen Hirnregionen ab. Mithilfe immunohistochemischer Färbungen mit IBA-1 wurde die reaktive Mikroglie speziell im Bereich des Kortex sowohl von Wildtyp-Tieren als auch von unbehandelten und mit NT4X passiv-immunisierten Tg4-42_{hom}-Mäusen untersucht (Abbildung 14). Dazu wurden im Kortex drei vorher definierte Areale (frontal, parietal und okzipital) analysiert (Absatz 2.3.5). Es konnte ein deutlicher Behandlungseffekt (einfache Varianzanalyse; $p = 0,0141$) im Sinne einer Abnahme der reaktiven Mikroglie von -32% bei den mit NT4X passiv-immunisierten Tg4-42_{hom}-Mäusen (Mittelwert: $102,6$; SEM $\pm 4,421$) im Vergleich zu den

unbehandelten Tg4-42_{hom}-Tieren (Mittelwert: 134,7; SEM \pm 14,14) erzielt werden. Im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (Mittelwert: 100,1; SEM \pm 5,322) zeigte die Gruppe der unbehandelten Tg4-42_{hom}-Tiere eine um +34% gesteigerte Mikrogliose. Somit konnte insgesamt eine im Wildtyp physiologisch vorkommende Mikrogliaaktivität unter Behandlung mit NT4X in Tg4-42_{hom}-Mäusen erreicht werden.

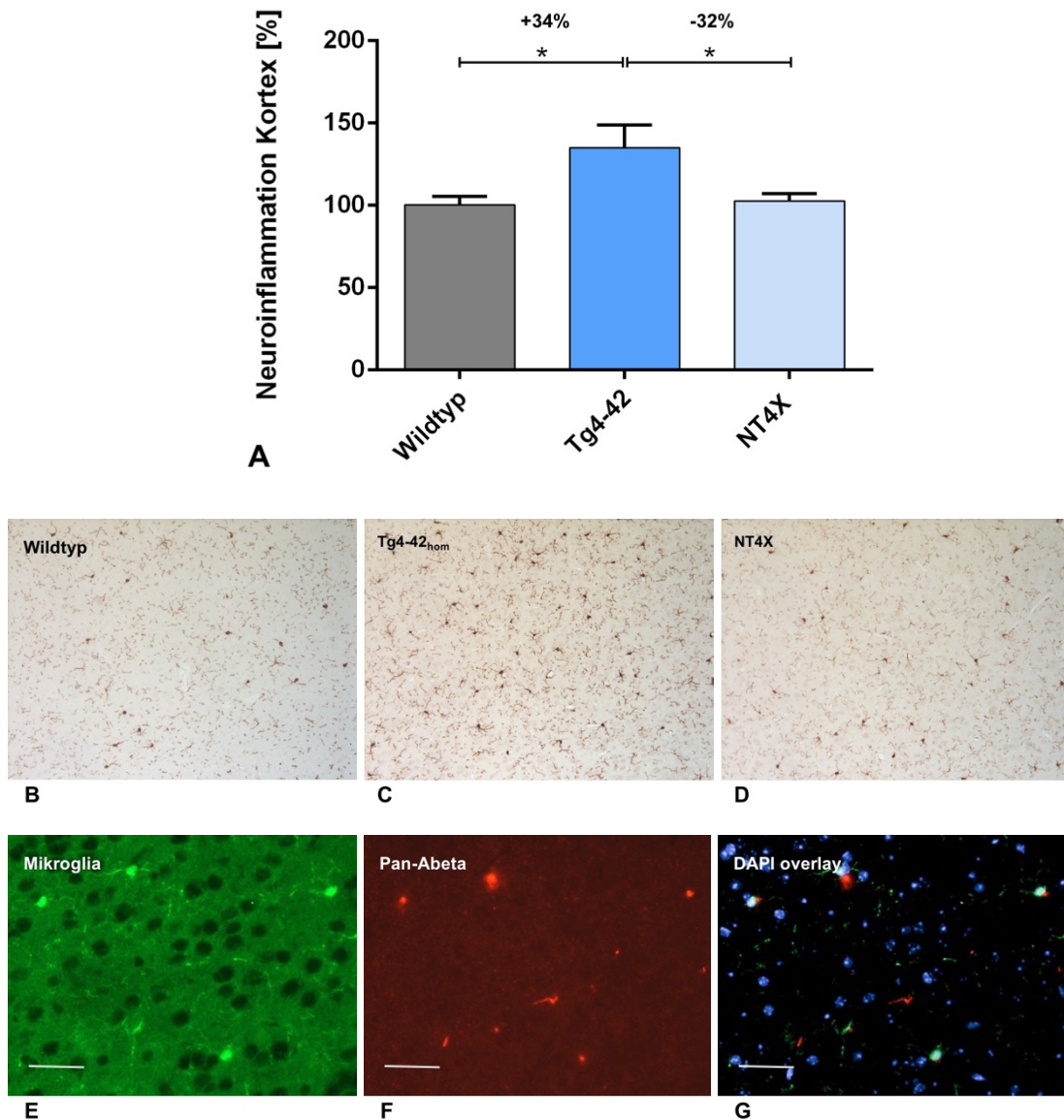


Abbildung 14: Behandlungseffekt durch passive Immunisierung mit NT4X. (A) In der einfachen Varianzanalyse zeigte sich eine deutliche Abnahme der Mikrogliose um -32% durch die Behandlung mit NT4X; alle Daten normalisiert auf die Wildtyp-Gruppe. Angabe in Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$. (B-D) DAB-Immunhistochemie mit IBA-1 zur Darstellung des Behandlungseffekts. Maßstab: 100 μ m (E-G) Immunfluoreszenz-Färbung: Es ist eine deutliche Überlagerung der fluoreszierenden Signale zwischen exprimiertem A β ₄₊₄₂, angefärbt mit Solanezumab_{BS} in der Wellenlänge 594 nm (rot), und der Mikrogliaaktivität, angefärbt mit IBA-1 in der Wellenlänge 488 nm (grün) zur erkennen, was im Sinne einer Immunantwort gegen die vorhandenen Abeta-Peptide verstanden werden kann. $n = 9$; Maßstab: 50 μ m.

3.5 Die Kombination der A β -Varianten A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42} verstärkt den Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus

Das Bigen-Mausmodell wurde entwickelt, um die Auswirkungen einer Ko-Expression der Peptide A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42} genauer untersuchen zu können. Beide Peptide stehen im Verdacht, in Kombination einen deutlich höheren Schaden im Sinne einer verstärkten Neurodegeneration zu bewirken (Lopez-Noguerola et al. 2018).

Vor diesem Hintergrund wurden im Alter von 3 und 6 Monaten sowohl TBA42 homo- und hemizygoten Tiere als auch Tg4-42 homo- und hemizygoten Tiere mit bigenen Tieren und einer Gruppe von Wildtyp-Tieren verglichen. Zur Analyse wurde die Design-basierte Stereologie in einem Bregma-Bereich von -1,22 mm bis -3,80 mm in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM und in einer einfachen Varianzanalyse über alle Gruppen in Bonferroni-korrigierter Form dargestellt. Es sei noch zu erwähnen, dass aufgrund der schweren Degeneration die Gruppe der TBA42 homozygoten Tiere bereits im Alter von 2 Monaten durch autorisierte Mitarbeiter der Arbeitsgruppe getötet wurde und somit eine Analyse nur im Alter von 2 Monaten möglich war.

3.5.1 Hochsignifikanter Nervenzellverlust bei Bigenen gegenüber allen Gruppen im Alter von 3 Monaten

Die quantitative Analyse der Nervenzellzahl im Alter von 3 Monaten ergab hochsignifikante Unterschiede (Abbildung 15; einfache Varianzanalyse; $p < 0,0001$) zwischen der Gruppe der bigenen Tiere (Mittelwert: 155389; SEM \pm 5103, $n = 5$) von 42% im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (Mittelwert: 267767; SEM \pm 11196; $n = 5$), 37% im Vergleich zu TBA42_{hemi} (Mittelwert: 246145; SEM \pm 6280; $n = 5$), 31% zu TBA42_{hom} (Mittelwert: 223937; SEM \pm 14553; $n = 3$), 37% zu Tg4-42_{hemi} (Mittelwert: 245925; SEM \pm 15234; $n = 5$) und 25% zu Tg4-42_{hom}-Mäusen (Mittelwert: 208057; SEM \pm 10452; $n = 5$). Des Weiteren ergab die Stereologie einen signifikanten Neuronenverlust von 22% zwischen Wildtyp-Tieren und Tg4-42_{hom}-Tieren. Alle weiteren Gruppen untereinander waren nicht signifikant.

Ebenfalls untersucht wurden die Volumina der CA1-Region in den einzelnen Gruppen. Eine signifikante Volumenabnahme (Abbildung 15; einfache Varianzanalyse; $p < 0,0002$) zeigte sich bei Bigenen (Mittelwert: 191019760; SEM \pm 7331094; $n = 5$) von 32% im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Mittelwert: 279141860; SEM \pm 17864921; $n = 5$), 37% im Vergleich zu TBA42_{hemi} (Mittelwert: 301019780; SEM \pm 13281828, $n = 5$) und 40% zur Gruppe der Tg4-42_{hemi}-Tiere (Mittelwert: 317213440; SEM \pm 25948000; $n = 5$). Weiterhin gab es eine signifikante Volumenabnahme von 26% zwischen Tg4-42 hemi- und

homozygoten Tieren (Mittelwert Tg4-42_{hom}: 233205920; SEM \pm 7334540; n = 5). Unter allen anderen Gruppen gab es keine signifikanten Volumenunterschiede.

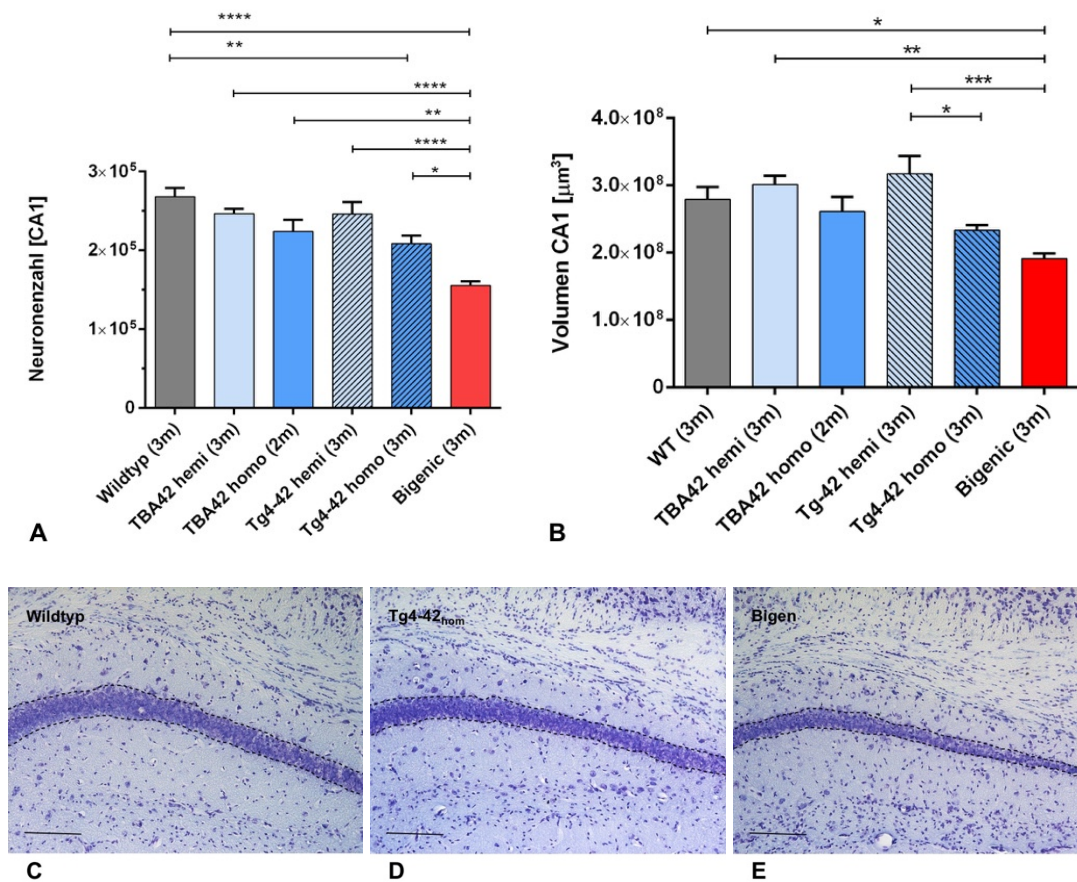


Abbildung 15: Effekt von A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42} im Bigen-Mausmodell auf die Neuronenzahl und das Volumen in der CA1-Region des Hippocampus zum Zeitpunkt von 3 Monaten. (A) Die Quantitative Analyse in Design-basierter Stereologie zeigte eine deutliche Reduktion der Neuronenzahl bei Bigenen gegenüber allen Gruppen. (B) Auch eine Volumenanalyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. (C-E) Volumenunterschiede in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus im Vergleich Wildtyp (C), Tg4-42_{hom} (D) und Bigen (E) in Kresylviolett-Färbung. Einfache Varianzanalyse; alle Daten angegeben in Mittelwert \pm SEM. ****p < 0,0001; ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; (A-B) Abkürzung m = Monat; n = 3-5 (C-E) Bregma: -1,46 mm, Maßstab: 100 μ m

3.5.2 Hochsignifikanter Nervenzellverlust bei Bigenen im Alter von 6 Monaten

Die stereologische Analyse der CA1-Region des Hippocampus zum Zeitpunkt von 6 Monaten deckte ebenfalls deutliche Effekte (Abbildung 16; einfache Varianzanalyse; p < 0,0001), bedingt durch die Kombination aus A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42}, bei den bigenen Tieren auf. Bigene (Mittelwert: 133707; SEM \pm 6494; n = 5) zeigten eine gravierende Reduktion der Neuronenzahl von 47% im Vergleich zum Wildtyp (Mittelwert: 253803; SEM \pm 20581, n = 6). Einen etwa gleich stark ausgeprägten Verlust der Nervenzellzahl von jeweils 34% konnte zwischen der Gruppe der Bigenen und den beiden hemizygoten Gruppen

TBA42_{hemi} (Mittelwert: 203465; SEM \pm 3140; n = 5) und Tg4-42_{hemi} (Mittelwert: 203092; SEM \pm 15743; n = 3) gefunden werden. Des Weiteren zeigte die Stereologie einen stark ausgeprägten Neuronenverlust in der Gruppe der Tg4-42_{homo}-Tiere (Mittelwert: 158246; SEM \pm 7186; n = 5) im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe.

Die Volumenanalyse des CA1-Bandes zeigte in der einfachen Varianzanalyse mit einem p = 0,0001 ebenfalls eine deutliche Abnahme des Volumens der CA1-Region von Bigenen zur Wildtyp-Gruppe und zu Tg4-42_{hemi}-Mäusen von jeweils rund 30% (Abbildung 16; Bigen Mittelwert: 185361160, SEM \pm 7668642; Wildtyp Mittelwert: 264823633, SEM \pm 14081566; Tg4-42_{hemi} Mittelwert: 265459333; SEM \pm 9776168). Außerdem nahm das Volumen signifikant zwischen Tg4-42_{homo}- (Mittelwert: 195557780; SEM \pm 13892399) und Tg4-42_{hemi}-Mäusen um rund 26%, sowie zwischen Tg4-42_{homo}-Tieren und der Wildtyp-Gruppe ab.

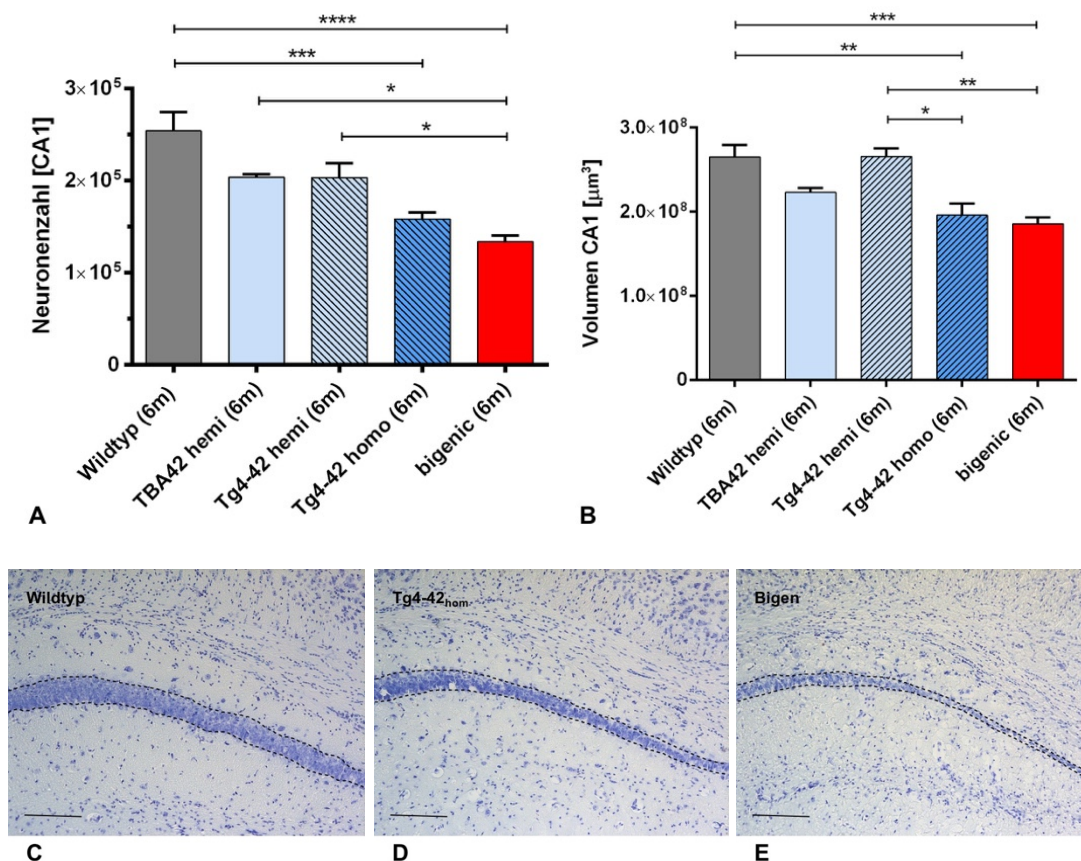


Abbildung 16: Effekt von $A\beta_{4-42}$ und $A\beta_{pE3-42}$ im Bigen-Mausmodell auf die Neuronenzahl und das Volumen in der CA1 Region des Hippocampus zum Zeitpunkt von 6 Monaten. (A) Im Altersverlauf konnte eine weitere Reduktion der Neuronenzahl bei Bigenen und Tg4-42_{homo}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. (B) Die Volumenberechnung ergab auch hier eine deutliche Abnahme bei Bigenen und Tg4-42_{homo}-Mäusen. Die Kresylviolett gefärbten Präparate (C-E) veranschaulichen den degenerativen Effekt der Kombination aus $A\beta_{4-42}$ und $A\beta_{pE3-42}$ im Bigen-Mausmodell. Es ist eine mit bloßem Auge deutlich sichtbare Abnahme der Volumina in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus zu erkennen. Einfache Varianzanalyse; alle Daten

angegeben in Mittelwert \pm SEM. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Abkürzung (A-B) m = Monat; n = 5; (C-E) Bregma: -1,46; Maßstab: 100 μm

3.5.3 Alters- und Genotyp abhängige Effekte durch die Kombination von $\text{A}\beta_{4-42}$ und $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$

Zusätzlich zu den oben genannten Ergebnissen konnte in weiteren unabhängigen t-Test-Analysen (Abbildung 17) ein auf die Neuronenzahl bezogener alters- und genotypabhängiger Effekt durch die Ko-Expression beider Abeta-Peptide, $\text{A}\beta_{4-42}$ und $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$, nachgewiesen werden. So wurden die Gruppen der 3 und 6 Monate alten Tg4-42_{homo}-Mäuse mit den bigenen Tieren gleichen Alters verglichen. Bei 3 Monate alten Tieren ergab sich eine signifikante und auf den Genotyp zurückzuführende Abnahme der Neuronenzahl mit einem $p = 0,0019$. Bei 6 Monate alten Tieren ergab sich eine immer noch signifikante Abnahme mit einem $p = 0,0351$.

Im Altersvergleich wurden die Tiere des gleichen Genotyps im Alter von 3 und 6 Monaten gegenübergestellt. Dabei konnte eine signifikante Abnahme der Neuronenzahl in der Gruppe der Tg4-42_{homo}-Tiere mit einem $p = 0,0044$ ermittelt werden. Die Abnahme der Neuronenzahl bei bigenen Tieren zeigte sich während des Alterungsprozesses von 3 zu 6 Monaten insgesamt als moderater ($p = 0,0304$). Dabei sei anzumerken, dass sich die Neuronenzahl der Bigenen im Alter von 6 Monaten bereits einem Plateau annäherte und der Nervenzellverlust in den ersten Lebensmonaten stärker ausgeprägt war (Abbildung 15-17).

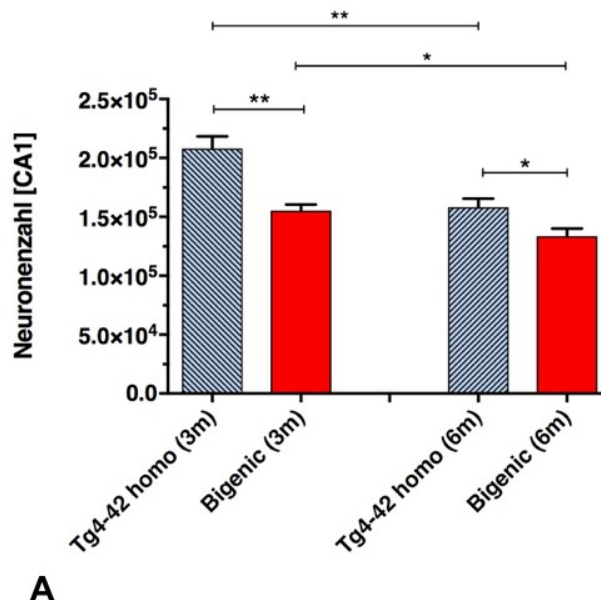


Abbildung 17: Alters- und Genotyp-abhängiger Effekt durch die Ko-Expression von $\text{A}\beta_{4-42}$ und $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$. (A) Unabhängige t-Test-Analysen zeigten einen deutlichen Genotypen-Effekt im Alter von 3 und 6 Monaten. Ebenso zeigte sich im Altersverlauf eine Abnahme der Neuronenzahl. n = 5; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

In Zusammenschau der in Absatz 3.5 gezeigten Ergebnisse konnte also demonstriert werden, dass eine Kombination beider Abeta-Varianten bei bigenen Tieren einen deutlichen Einfluss auf die Schwere der alzheimerartigen Degeneration im Sinne einer Abnahme der hippocampalen Neuronenzahl, speziell in der CA1-Region des Hippocampus, hat. Dies bezieht sich sowohl auf den jeweiligen Genotyp als auch auf den Alterungsprozess selbst.

4 Diskussion

4.1 Der Einfluss von N-trunkiertem $A\beta_{4-42}$ auf die Neuronenzahl der CA1-Region des Hippocampus, Striatum und piriformer Kortex im Tg4-42-Mausmodell

4.1.1 N-trunkiertes $A\beta_{4-42}$ führt zu einem signifikanten Neuronenverlust in der CA1-Region des Hippocampus bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen

Die Alzheimer-Krankheit ist eine progressiv verlaufende, neurodegenerative Erkrankung, die durch ihre typischen Merkmale in Form extrazellulärer Amyloid-Ablagerungen und intrazellulärer Tau-fibrillen gekennzeichnet ist. Verschiedenste Hypothesen wurden zur Erklärung der Alzheimer-Entstehung entwickelt (zusammengefasst von (Terry und Buccafusco 2003; Sanabria-Castro et al. 2017)). Zu den einflussreichsten Hypothesen zählt dabei die im Oktober 1991 von Hardy *et al.* postulierte und im weiteren Verlauf modifizierte Amyloid- β -Kaskaden-Hypothese, die beschreibt, dass erhöhte $A\beta$ -Spiegel, sei es durch erhöhte Produktion oder verminderten Abbau, zur Ansammlung und Bildung unlöslicher toxischer $A\beta$ -Aggregate führen (Hardy und Allsop 1991; Hardy und Higgins 1992; Wirths et al. 2004) und diese wiederum die weitere pathophysiologische Maschinerie antreiben, die letztendlich in Entzündung, Atrophie und damit verbundenen alzheimer-typischen kognitiven Veränderungen mündet. Mittlerweile wird angenommen, dass intraneuronal lösliches Abeta, lange vor der charakteristischen Plaque-Bildung, in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit eine entscheidende Rolle spielt (Wirths et al. 2004).

Mit der erstmaligen Beschreibung verschiedener N-terminal trunkierter und modifizierter $A\beta$ -Varianten, unter anderem auch des $A\beta_{4-42}$ -Peptids, durch Masters *et al.* im Jahre 1985 (Masters et al. 1985) und der zwei Jahre später erstmaligen vollständigen Entschlüsselung des *APP*-Gens - als Ursprung des eigentlichen Vorläuferproteins der $A\beta$ -Peptide (Kang et al. 1987) - wurde der Grundstein einer bis heute andauernden intensiven Forschungsarbeit gelegt. Lange Zeit wurde die Rolle von $A\beta_{4-42}$, beginnend mit Phenylalanin an Position 4 des N-Terminus, im Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathogenese vernachlässigt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass gerade $A\beta_{4-42}$ sowohl Plaque-assoziiert in Alzheimer-Gehirnen als auch in relativ hohem Maße in Hirnproben bei Patienten mit vaskulärer Demenz zu finden ist (Masters et al. 1985; Lewis et al. 2006). Außerdem fand man heraus, dass sich $A\beta_{4-42}$, im Gegensatz zu Vollängen-Abeta, schnell zu stabilen toxischen Aggregaten in Form von β -Faltblatt-Fibrillen zusammenlagert (Klein 2002; Bouter et al. 2013) und dies hauptsächlich durch den N-Terminus begünstigt wird (Haupt et al. 2012). Wenige Jahre nach Entdeckung des $A\beta_{4-42}$, im Jahre 1992 wurde schließlich auch eine

damals neue A β -Variante identifiziert, die aus Hirnproben von Alzheimer-Patienten isoliert wurde – das A β_{pE3-42} (Mori et al. 1992). Ähnlich wie A β_{4-42} hält auch A β_{pE3-42} , beginnend mit Pyroglutamat an Position 3 des N-Terminus, einen weiteren großen Anteil an unlöslichem Abeta in senilen Plaques und neigt dazu, stabile β -Faltblatt-Strukturen einzunehmen (Mori et al. 1992; Saido et al. 1995; He und Barrow 1999; Thal et al. 2015). Darüber hinaus konnten Portelius *et al.* mithilfe von Immunpräzipitation und Massenspektrometrie demonstrieren, dass A β_{1-42} , A β_{pE3-42} , A β_{4-42} und A β_{1-40} die dominierenden A β -Isoformen in Hippocampus und Kortex von Alzheimer-Patienten darstellen (Portelius et al. 2010). In Zusammenschau dieser Tatsachen erwuchs das Interesse, einen genaueren Blick auf die Rolle N-trunkierter A β -Peptide in Bezug auf die Alzheimer-Pathogenese zu werfen.

Um die komplexen pathophysiologischen Vorgänge *in vivo* untersuchen und verstehen zu können, wurden in der Vergangenheit dazu zahlreiche Mausmodelle entwickelt. Dazu zählen beispielsweise die Mausmodelle 5xFAD (Oakley et al. 2006), APP/PS1KI (Casas et al. 2004) und 3xTg (Oddo et al. 2003). Diese verwenden als genetische Grundlage Mutationen in den für die familiäre Alzheimer-Krankheit (FAD) typischen Genen, wie das *APP*-Gen und die Präsenilin-Gene 1 und 2 (PSEN1/ PSEN2). Schlüsselenzyme in der APP-Prozessierung werden durch sie kodiert, was bei der familiären Alzheimer-Krankheit zu einem APP-Fehlmetabolismus führt und so die Progredienz der Erkrankung verstärkt (Hutton et al. 1998). Im 5xFAD-Mausmodell kommt es unter anderem zu einer Überexpression des humanen APP695-Amyloid-Vorläuferproteins, welches drei - die Schwedische- (Mullan et al. 1992), die Florida- (Eckman et al. 1997) und die London-Mutation (Goate et al. 1991) – trägt. Darüber hinaus exprimieren 5xFAD-Mäuse humanes PS1 mit der M156L/L286V-Mutation. Die 5 Mutationen (5x FAD) sorgen so im Mausmodell für einen rapiden Anstieg des A β_{42} -Spiegels (Oakley et al. 2006). APP/PS1KI-Mäuse hingegen exprimieren APP mit der London- und Schwedisch-Mutation und tragen darüber hinaus die im Präsenilin-1-Gen lokalisierte M233T/L235P-Mutation (Casas et al. 2004). Das 3xTg-Mausmodell trägt die Mutationen PS1-M146, APPSwe und tauP301L (Oddo et al. 2003). So zeigen diese Modelle relevante alzheimertypische Merkmale und können in vielfältiger Weise in die Grundlagenforschung eingebunden werden. Wohingegen 3xTg-Mäuse zur gesteigerten A β -Expression zusätzlich eine Hirnregion-spezifische Tau-Pathologie zeigen (wenn auch erst weit nach der intraneuronalen A β -Expression), so konzentriert sich der Pathomechanismus bei APP/PS1KI und 5xFAD-Tieren in großen Teilen auf den Einfluss der exprimierten A β -Varianten, darunter auch der N-trunkierten Form A β_{4-42} . Darüber hinaus korreliert der Anstieg von intraneuralem Abeta mit dem Nervenzellverlust; jedoch nicht mit der Bildung von Abeta-Ablagerungen oder synaptischen Dysfunktionen (Casas et al. 2004; Oakley et al. 2006; Christensen et al. 2010). Die Erkenntnis über den raschen Anstieg einer heterogenen Zusammensetzung von Abeta-Varianten und deren Einflüsse auf Verhalten und Kognition am Modell eröffnet so neue Wege, diese Peptide als therapeutische Ziele anzuvisieren. Problematisch ist jedoch, dass solche Mausmodelle FAD-Mutationen tragen und somit schlecht mit der sporadischen

Alzheimer-Krankheit vergleichbar sind, da nur der kleinste Teil der Erkrankungsfälle auf eine familiäre Alzheimer-Demenz zurückzuführen ist (Alzheimer's Disease International 2015). Darüber hinaus waren an diesen Mausmodellen isolierte Untersuchungen zu den Folgen chronischer Expression neurotoxischer N-trunkierter A β -Varianten, wie bspw. A β ₄₂, nicht möglich.

So entwickelten Bouter *et al.* 2013 das Tg4-42-Mausmodell, das ausschließlich humanes A β ₄₂ gebunden an das murine Thyrotropin-Releasing-Hormon exprimiert (Bouter et al. 2013). Es entstand ein Mausmodell, welches, anders als bspw. die Mauslinien TBA2 oder TBA42, ohne mutierte Peptide auskommt, um *in vivo* und damit näher an die sporadische Alzheimer-Krankheit angelehnt, Untersuchungen über die Auswirkungen eines einzelnen spezifischen, neurotoxischen N-trunkierten Peptids durchzuführen. Abeta-Expression konnte bereits ab einem Alter von 2 Monaten in der CA1-Region des Hippocampus entdeckt werden. Daneben konnte durch immunhistochemische Färbemethoden auch im okzipitalen Kortex, Striatum und piriformen Kortex A β -Expression gefunden werden (Bouter et al. 2013). Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen mit dem Pan-Abeta Antikörper Solanezumab_{BS} an 2 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen.

Eines der wichtigsten Kennzeichen in der Alzheimer-Pathologie sind der Neuronenverlust und die ihn begleitende Hirnatrophie. Obwohl eine Vielzahl an Mausmodellen mit alzheimerartigen Veränderungen entwickelt wurde, gibt es nur wenige Modelle die einen Nervenzellverlust zeigen. So konnte ein massiver Nervenzellverlust in der CA1-/2-Region bei APP/PS1KI-Mäusen (Casas et al. 2004; Christensen et al. 2010) und in *Lamina V* des Kortex und Subikulum bei 5xFAD-Mäusen beobachtet werden (Oakley et al. 2006; Eimer und Vassar 2013; Jawhar et al. 2012). Jeweils war der Verlust besonders stark in Regionen mit hohen intraneuronalen Abeta-Spiegeln ausgeprägt. Auch bei Tg4-42_{hom}-Tieren konnten stereologische Untersuchungen der CA1-Region des Hippocampus erste Neuronenverluste ab einem Alter von etwa 4 Monaten belegen. Ein Maximum war bei -66% im Alter von 8 Monaten bei homozygoten Tg4-42 Mäusen im Vergleich zum WT erreicht und korrelierte dabei mit einer Verschlechterung des räumlichen Gedächtnisses. Wohingegen gleichaltrige hemizygoten Tg4-42-Tiere einen Neuronenverlust von -38% zeigten, so ergaben sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Defizite im räumlichen Lernverhalten (Bouter et al. 2013; Antonios et al. 2015). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen decken sich in etwa mit den in der Vergangenheit erhobenen Daten. Im Mittel wurden ca. 153000 Neurone im CA1-Band gezählt (Antonios et al. 2015) - zu der in dieser Arbeit erhobenen mittleren Neuronenzahl von etwa 158000. Ergänzend dazu zeigten Tg4-42_{hom}-Tiere ab einem Alter von etwa 5 Monaten erste Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis, welche umso deutlicher ab einem Alter von 6 Monaten registriert wurden (Bouter et al. 2013; Antonios et al. 2015). Diese Tatsachen können gut mit den von Broadbent *et al.* beschriebenen Beobachtungen in Einklang gebracht werden. So ist eine bilaterale hippocampale Läsion von 30 - 50% des Gesamtvolumens nötig, um Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis hervorzurufen. Mit einer Vergrößerung der Läsion auf über

50% Gesamtvolumen des Hippocampus verschlechterte sich die Gedächtnisleitung in ähnlicher Weise (Broadbent et al. 2004). Außerdem fand man in weiteren Untersuchungen im Zusammenhang zwischen hippocampalem Volumen und räumlicher Gedächtnisleistung heraus, dass nur etwa 20 - 40% des Gesamtvolumens notwendig sind, um effizientes räumliches Lernen zu erreichen (Moser et al. 1995). Interessant ist auch, dass obwohl das Tg4-42-Mausmodell keine extrazellulären Plaques oder Tau-Pathologie ausbildet, einen massiven Neuronenverlust mit damit einhergehenden Defiziten im räumlichen Bezugsgedächtnis zeigt. So korreliert der Verlust an Nervenzellen mit der etwa ab dem 2. Monat beginnenden und mit dem Alter stetig abnehmenden Ansammlung von intraneuronalem Abeta bei homozygoten Tg4-42-Tieren (Bouter et al. 2013).

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass 6 Monate alte Tg4-42_{hom}-Tiere, ergänzend zu den vorangegangenen Analysen, auch in dieser Bestätigung der Beobachtungen einen Nervenzellverlust von etwa 40% im Vergleich zum Wildtyp zeigten und der Verlust gerade die kritische Grenze der beobachtbaren Defizite im räumlichen Bezugsgedächtnis ausmachen.

4.1.2 N-trunkiertes A β ₄₋₄₂ hat keinen Einfluss auf die Neuronenzahl im Hirnareal Striatum bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen

Das Striatum, größtes Kerngebiet der Basalganglien und im Marklager des Großhirns gelegen, trägt als zentrale Schaltstelle motorischer Impulse vor allem zu einer inhibitorischen Beeinflussung der aus dem präfrontalen Assoziationskortex stammenden Bewegungsabläufe bei (Trepel 2012; Lindroos et al. 2018). So ist das Striatum (hier im Besonderen das dorsale Striatum) - gemeinsam mit dem Hippocampus und dem *corpus amygdaloideum* (und möglicherweise weiteren Hirnstrukturen) - Teil eines komplexen neuronalen Netzwerks, welches auf verschiedene Weise, teils unabhängig, teils interagierend, neuronale Information verarbeitet und speichert, die letztendlich in einem bestimmten Verhalten resultiert (White und McDonald 2002). Nach der Theorie des sogenannten „*multiple parallel memory system (MPMS)*“ wird räumliche Information in einem den Hippocampus beinhaltenden Regelkreis verarbeitet, wohingegen bestimmte Formen der instrumentellen Konditionierung im Striatum verarbeitet werden (Lee et al. 2008). Eine Vielzahl von verhaltensneurologischen Untersuchungen an Säugetieren, darunter Ratten, Affen und Menschen zeigte, dass umschriebene Läsionen in den Basalganglien nicht nur Einfluss auf die motorische Funktion haben, sondern vielmehr auch bestimmte Formen des Lernens, wie beispielsweise das „Reiz-Antwort-Lernen“ beeinflussen können (Packard und Knowlton 2002). So konnte durch eine gezielte Läsion des Striatums bei Mäusen eine Beeinträchtigung des *cued learning* mit gleichzeitiger Verbesserung des räumlichen Lernens im *Morris water maze test* beobachtet werden. Umgekehrt führte eine exzitotoxische Läsion des Hippocampus zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens bei gleichzeitiger Verbesserung des *cued learning* im *Morris water maze test* (Lee et al. 2008).

Der *Morris water maze test* dient als valider Verhaltenstest zur Untersuchung des räumlichen Bezugsgedächtnis und des Lernverhaltens (Morris 1984). Bei diesem Test lernen Mäuse mithilfe räumlicher Zeichen eine in einem Wasserbecken kurz unter der Wasseroberfläche verborgene Plattform zu lokalisieren. Mithilfe einer Kamera werden Fluchtzeit, Schwimmgeschwindigkeit und bevorzugter Aufenthaltsort im Wasserbecken aufgezeichnet (Bouter et al. 2013). Schädigungen in Hirnarealen wie Hippocampus, Striatum oder Kleinhirn können hierbei die zu untersuchenden Leistungen beeinträchtigen (D’Hooge und De Deyn 2001). In vielfältiger Weise konnten in der Vergangenheit Hippocampus-abhängige Defizite im räumlichen Arbeitsgedächtnis an unterschiedlichen Mausmodellen demonstriert werden, darunter die Mausmodell 5XFAD, 3xTg und APP/PS1KI (Billings et al. 2005; Webster et al. 2013; Bouter et al. 2014). Darüber hinaus konnten auch im Tg4-42-Mausmodell genotypabhängig deutliche Defizite im *Morris water maze* beobachtet werden, darunter sowohl im *acquisition training* (zur Testung der Fähigkeit räumlichen Lernens) als auch im *Probe Trail* (zur Testung des räumlichen Bezugsgedächtnisses). Hingegen zeigten alle untersuchten Mäuse keine Unterschiede in den Schwimmgeschwindigkeiten im *cued training*, was auf intakte motorische und visuelle Fähigkeiten schließen lässt (Bouter et al. 2014). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Striatum als anatomisches Korrelat für die Gedächtnisdefizite unwahrscheinlich ist. Vielmehr scheinen diese durch eine Schädigung des Hippocampus bedingt zu sein.

Bereits in einer früheren Arbeit wurde eine $A\beta_{4-42}$ -Expression im Striatum nachgewiesen und die Neuronenzahl bei 8 Monate alten Tg4-42_{hom}-Tieren untersucht. Dabei wurde kein Unterschied in der Neuronenzahl im Vergleich zum gleichaltrigen Wildtyp festgestellt (Bouter et al. 2013). Diese Beobachtungen decken sich gut mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen. Auch hier zeigte sich eine Aufnahme des DAB-Farbstoffs in striatale Zellen. Die Aufnahme war jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt, als diese beispielsweise in der CA1-Region des Hippocampus zu beobachten war. Eine Analyse der Neuronenzahl, diesmal bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen, ergab ebenfalls keine Unterschiede im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Tieren. Ebenso zeigte eine Volumenanalyse des Striatums keine Unterschiede zwischen transgenen Mäusen und dem Wildtyp. Dies lässt vermuten, dass neurodegenerative Prozesse im Sinne eines Neuronenverlustes, zumindest im Alter von 6 und 8 Monaten, noch nicht stattgefunden haben. So scheint das Striatum trotz der erkennbaren Expression von $A\beta_{4-42}$ eine, wenn überhaupt, nur untergeordnete Rolle in der vorherrschenden Alzheimer-Pathologie im Tg4-42-Mausmodell zu spielen.

Auch in menschlichen Gehirnproben konnte eine $A\beta$ -Expression im Bereich des Striatum entdeckt werden. Diese vom „diffusen Typ“ beschriebene $A\beta$ -Expression konnte in großer Anzahl und Ausdehnung auch im Isokortex bei nicht dementen Patienten gefunden werden (Dickson et al. 1992), was die Schlussfolgerung zulässt, diese Läsionen als nicht direkt toxisch zu bewerten. Jedoch bleibt der Stellenwert dieser Fälle des „pathologischen Alterns“ unklar (Duyckaerts et al. 2009).

4.1.3 N-trunkiertes A β_{4-42} hat keinen Einfluss auf die Neuronenzahl im Hirnareal piriformer Kortex bei 6 Monate alten Tg4-42-Mäusen

Eine sehr frühe pathologische Veränderung bei Alzheimer-Patienten stellt die Beeinträchtigung der olfaktorischen Funktion dar (Doty et al. 1987). So zeigen Alzheimer-Patienten bereits lange vor Präsenz weiterer Symptome im präklinischen und im Stadium des *MCI* Veränderungen in der Geruchswahrnehmung (Bacon et al. 1998; Graves et al. 1999; Tabert et al. 2005; Wesson et al. 2010). Der piriforme Kortex, auch als primäre Riechrinde bezeichnet, liegt an der Basis des Frontallappens und geht rostro-medial in den Temporallappen über (Trepel 2012). Auch funktionell sind beide Areale eng miteinander verknüpft. So ist der piriforme Kortex Teil der Riechbahn und erhält über die *Stria olfactoria lateralis*, aus dem lateralen Teil des Traktus olfactorius gespeist, Geruchsinformation aus dem *Bulbus olfactorius*. Die *Stria olfactoria lateralis* führt die Geruchsinformation darüber hinaus auch zu weiteren übergeordneten Zentren wie dem *Corpus amygdaloideum* und dem entorhinalen Kortex [genauer zum olfaktorischen System siehe (Trepel 2012; Masurkar und Devanand 2014)]. Studien an verschiedenen transgenen APP-Mausmodellen konnten Defizite im olfaktorischen Verhalten, wie beispielsweise im Geruchsgedächtnis und im Lernen von Gerüchen, demonstrieren (Van Dijk et al. 2008; Zhuo et al. 2008; Montgomery et al. 2011). Darüber hinaus beobachteten Wesson *et al.* im Jahre 2010, dass Tg2576-APP-Mäuse, gekennzeichnet durch Überexpression von humanem APP695 mit der Mutation KM670/671NL und erhöhten A $\beta_{40/42}$ -Spiegeln, Plaque-Pathologie ohne Neuronenverluste in der CA1 Region (Hsiao et al. 1996; Irizarry et al. 1997), in den meisten Strukturen des olfaktorischen Systems, inklusive übergeordneter Hirnregionen, A β -Belastungen aufwiesen und diese mit einer fortschreitenden Beeinträchtigung der olfaktorischen Funktion einhergingen (Wesson et al. 2010). Besonders betroffen von dieser Pathologie ist auch der entorhinale Kortex, der neben Anteilen an der Riechbahn eine entscheidende Rolle, als Verbindung zwischen Neokortex und Hippocampus, in Prozessen der Gedächtnisleistung und Kognition spielt (Chapuis et al. 2013). So zeigt der entorhinale Kortex neben einer ausgedehnten intraneuronalen A β -Pathologie auch einen deutlichen Nervenzellverlust, als Kennzeichen des neurodegenerativen Prozesses in humanem Gewebe (Gómez-Isla et al. 1996; Gouras et al. 2000). Ergänzend zur A β -Pathologie im entorhinalen Kortex konnte auch im piriformen Kortex von Tg4-42-Mäusen eine deutlich ausgeprägte intraneuronale A β -Ansammlung beobachtet werden (Bouter et al. 2013). Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Eine darauffolgende stereologische Analyse der Neuronenzahl an 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Tieren zeigte jedoch keinen Unterschied in der Zellzahl im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Tieren. Auch konnte bei Berechnung des Volumens des piriformen Kortex mithilfe der Cavalieri-Formel kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. So scheint der piriforme Kortex, zumindest zum Zeitpunkt von 6 Monaten, nicht direkt in die in diesem Mausmodell beobachtbare Alzheimer-Pathologie involviert zu sein. Weitere Analysen zur Abeta-Belastung und Neuronenzahl zu

späteren Zeitpunkten im piriformen Kortex könnten Aufschluss über eine weitere Beteiligung an der Progression der Erkrankung geben. Des Weiteren sind Untersuchungen zur olfaktorischen Funktion bei Tg4-42-Mäusen mit der Fragestellung notwendig, ob überhaupt, und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt, Störungen im Bereich des Riechvermögens auftreten.

Die Tatsache also, dass trotz deutlicher A β -Expression keine Zeichen von Neurodegeneration im Sinne des Nervenzellverlusts im piriformen Kortex zu beobachten sind, führt zu der Annahme, dass die anatomischen Korrelate bei der Alzheimer-Krankheit und ihren Beeinträchtigungen in Merkfähigkeit und Kognition (und auch in Bezug auf das Riechvermögen) in anderen Schlüssel-Arealen wie dem Hippocampus oder möglicherweise auch dem entorhinalen Kortex zu liegen scheinen.

4.2 Mikrogliose im Tg4-42-Mausmodell

4.2.1 N-trunkiertes A β ₄₋₄₂ führt zu Mikrogliose im Kortex-Areal bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen

Die Neuroinflammation zählt neben A β -Ablagerungen und Tau-fibrillen zu den Hauptmerkmalen der Alzheimer-Krankheit. Sie ist charakterisiert durch das Vorhandensein von reaktiven Astrozyten und aktivierten Mikrogliazellen (Akiyama et al. 2000). Das erhöhte Vorkommen von Astrozyten und Mikrogliazellen in direkter Nachbarschaft zu Amyloid-Beta Ablagerung weist auf eine enge Beziehung in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit dieser beiden Merkmale zueinander hin (Spangenberg et al. 2016). Neben den zellulären Komponenten zählen auch humorale Veränderungen zum neuroinflammatorischen Prozess. So konnten beispielsweise erhöhte Mediatoren-Spiegel bspw. des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) in Seren von Alzheimer-Patienten (Fillit et al. 1991) oder des auf Mikrogliazellen chemotaktisch wirkenden *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) in direkter Umgebung von Amyloid-Ablagerungen gefunden werden (Ishizuka et al. 1997). Mikroglia sind ortständige Makrophagen des zentralen Nervensystems und agieren autonom vom peripheren Monozyten-Makrophagen-System. Zu deren Hauptaufgabe zählt die Phagozytose von Pathogenen und Zelltrümmern neuronalen und nicht-neuronalen Ursprungs zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Hirngewebe. Auch scheinen sie eine entscheidende Rolle in der Neuro- und Synaptogenese zu spielen (Schafer und Stevens 2015). In Alzheimer-Gehirnen ist die Mikroglia-Aktivität über einen längeren Zeitraum pathologisch erhöht (Van Eldik et al. 2016). So scheinen sie teilweise ihre phagozytären Eigenschaften zu verlieren und möglicherweise sogar toxische Funktionen auszubilden (Jay et al. 2015). Astrozyten hingegen haben physiologischerweise nutritive Funktionen und bilden ein Stützgerüst für neuronale Strukturen. Außerdem spielen sie eine aktive Rolle in neurophysiologischen Prozessen der Neurotransmission (Van Eldik et al. 2016). Bei der Alzheimer-Krankheit sind neuroinflammatorische Prozesse in

pathologischem Maße erhöht, was zu einer Progression der Neurodegeneration auch im Sinne eines Nervenzellverlusts führt (Spangenberg et al. 2016).

Auch am Mausmodell konnten alzheimerartige neuroinflammatorische Prozesse beobachtet werden. So begannen 5xFAD-Mäuse bereits ab einem Alter von 2 Monaten Amyloid-Ablagerungen und Gliose vor allem im Subikulum und tieferen kortikalen Schichten auszubilden (Oakley et al. 2006). Ähnlich wie in Alzheimer-Gehirnen zu beobachten, wurden auch bei 5xFAD-Mäusen die A β -Ablagerungen von GFAP-immunreaktiven Astrozyten umgeben (Oakley et al. 2006). Auch bei APP/PS1KI und TBA42-Mäusen zeigte sich neben der hohen intraneuronalen A β -Last eine deutliche Astroglie, die als Konsequenz der gesteigerten A β -Expression interpretiert wurde (Casas et al. 2004; Wittnam et al. 2012). Im Tg4-42-Mausmodell, welches durch starke intraneuronale A β_{4-42} -Akkumulation ohne Ausbildung von Amyloid-Plaques gekennzeichnet ist, konnten ebenfalls erhöhte Aktivitäten von Astrozyten und Mikroglia festgestellt werden (Bouter et al. 2013). Ergänzend zu den bisherigen Untersuchungen konnte in dieser Arbeit eine um etwa +34% gesteigerte Mikrogliaaktivität bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp im Kortex-Areal festgestellt werden. Diese Region zeigte eine erhöhte intrazelluläre Abeta-Ansammlung und korrelierend dazu mit IBA-1 eine sichtbare Erhöhung aktivierter Mikroglia. In Probefärbungen mit dem Astrozyten-spezifischen Antikörper GFAP konnte jedoch kein Signal im Kortex-Areal festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass eine astrozytäre Beteiligung an diesen Prozessen unwahrscheinlich ist.

Es stellt sich also die Frage welche Bedeutung eine isolierte Mikroglie im Kortex-Areal im Rahmen der Alzheimer-Pathologie überhaupt einnimmt. So bilden die Ergebnisse einen Querschnitt über Anteile des visuellen, somatosensorischen und somatomotorischen Kortex, was es schwierig macht genaue Rückschlüsse auf ein einzelnes Areal zu zulassen. Weitere stereologische Analysen in den einzelnen Abschnitten müssten angestellt werden, um die möglichen Auswirkungen im Sinne eines Neuronenverlustes sichtbar zu machen. Abschließend kann festgehalten werden, dass eine chronische Belastung mit N-trunkiertem A β_{4-42} , trotz fehlender Plaque-Pathologie, eine signifikante isolierte Erhöhung der Mikrogliaaktivität im Kortex bewirkt. Welche Auswirkungen daraus resultieren bleibt offen.

4.2.2 Die passive Immunisierung mit dem Antikörper NT4X führt zu einer signifikanten Verbesserung der Mikroglie im Kortex-Areal bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen

Die passive Immunisierung als neue Therapiemöglichkeit rückt auch bei der Alzheimer-Krankheit immer mehr in den Fokus moderner Forschungsarbeit. Viele Antikörper durchlaufen gerade präklinische Testphasen um die genauen Wirkprofile und vielfältigen Wechselwirkungen der Antikörper besser zu verstehen, bevor sie in ersten klinischen Studien auch am Menschen getestet werden können; so auch der im Jahre 2013 vorgestellte

Antikörper NT4X (Antonios et al. 2013). NT4X ist der erste Antikörper, der speziell N-trunkierte und modifizierte A β -Varianten erkennt. Seine stärkste Affinität zeigt er dabei zu N-trunkierten A β_{4-x} mit Phenylalanin an Position 4 der Aminosäurekette, wohingegen eine Mutation des N-Terminus bspw. zu Alanin (A β_{4A-42}) oder Prolin (A β_{4P-42}) zu einer vollständigen Hemmung der Bindungsfähigkeit führt (Antonios et al. 2013). Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass N-trunkierte und am N-Terminus modifizierte A β -Varianten, darunter vor allem auch A β_{pE3-42} und A β_{4-42} , in Gehirnen von Alzheimer-Patienten in besonders hohem Maße anzutreffen sind (Masters et al. 1985; Lewis et al. 2006; Portelius et al. 2010) und diese sowohl *in vitro* (Bouter et al. 2013) als auch *in vivo* alzheimertypische toxische Wirkungen entfalten (Wittnam et al. 2012; Bouter et al. 2013). So eignet sich NT4X sehr gut zur Untersuchung möglicher Auswirkungen dieser A β -Varianten an für das jeweilige Peptid spezifische Mausmodell und bietet vielmehr darüber hinaus eine potentielle Therapiemöglichkeit des Morbus Alzheimer (Antonios et al. 2013).

Neben dem Antikörper NT4X wurden in der Vergangenheit zahlreiche weitere anti-A β -Antikörper entwickelt, zu diesen unter anderem Bapineuzumab, Crenezumab und Solanezumab gehören. Bapineuzumab (Eli Lilly/Pfizer Inc./Johnson&Johnson), der erste in klinischen Studien getestete anti-A β -Antikörper, richtet sich gegen fibrilläres und lösliches A β_{1-5} (Lannfelt et al. 2014), wohingegen sich die Bindungseigenschaften von Crenezumab (Genentech) gegen viele Formen von A β inklusive Monomeren, Oligomeren und A β -Fibrillen richtet (Spencer und Masliah 2014). Die Affinität von Solanezumab (Eli Lilly and Company) wiederum zielt auf die mittlere Region von löslichen A β -Monomeren (Lannfelt et al. 2014) und bindet somit unspezifisch an alle A β -Varianten. Auch wenn die Wirksamkeit von Bapineuzumab im Sinne einer Reduktion der Amyloid-Last in einigen Studien am Patienten belegt werden konnte (Rinne et al. 2010), so wurde seine weitere Testung 2012 in klinischen Phase-III Studien eingestellt, da die Behandlung mit vasogenen Ödemen und intrazerebralen Mikroblutungen vergesellschaftet war (Lannfelt et al. 2014). Auch eine multinationale klinische Phase-III-Studie zu Solanezumab, die sog. EXPEDITION3, welche ausschließlich klinische Fälle zur milden Form der Alzheimer-Demenz umfasste, wurde im Jahre 2016 vorzeitig beendet. Eli Lilly berichtete dazu, dass keine signifikante Verlangsamung der kognitiven Defizite bei mit Solanezumab behandelten Patienten im Vergleich zum Placebo zu beobachten war (Eli Lilly and Company 2016).

In einem direkten Vergleich mit humanisierten Biosimilars von Bapineuzumab, Crenezumab, Solanezumab und NT4X an humanem Gewebe und in verschiedenen Mausmodellen wurden weitere Merkmale dieser Antikörper demonstriert (Bouter et al. 2015). So zeigte NT4X im Vergleich zu den drei anderen getesteten Biosimilars an humanem Gewebe kaum und in 68% der sporadischen Fälle gar keine Affinität zu Plaques. Außerdem konnte in drei Monate alten Tg4-42-Mäusen eine starke intraneuronale

Reaktivität mit Crenezumab, Solanezumab und NT4X entdeckt werden; wohingegen Bapineuzumab kein intraneurales A β erkannte. Solanezumab war darüber hinaus der einzige der, wie NT4X, neben A β_{4-42} auch A β_{pE3-42} erkannte (Bouter et al. 2015).

Zusätzlich zu der im Kortex-Areal beobachteten Erhöhung der Mikrogliaaktivität konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine passive Immunisierung mit NT4X bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen eine signifikante Verbesserung der Mikrogliose von 32% im Vergleich zum Wildtyp bewirkte. So war die Aktivität der Mikroglia durch NT4X modulierbar und konnte dabei fast auf ein bei den Wildtyp-Tieren als „normal“ angenommenes Maß reduziert werden. Zusätzlich dazu offenbarten frühere Untersuchungen der CA1-Region des Hippocampus, dass die passive Immunisierung mit NT4X bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen einen Neuronenverlust im Vergleich zur Kontrolle verlangsamte. Homozygote Tg4-42-Mäuse hatten 13% mehr Neurone im CA1-Band als nicht behandelte Mäuse (Antonios et al. 2015). Neben stereologischen Auswertungen der Neuronenzahl des Kortex-Areal im Alter von 6 Monaten würden weitere Untersuchungen auch an älteren Tieren Rückschlüsse auf den Verlauf und Zusammenhang von Mikroglia und Abeta-Expression zu lassen. Interessant ist die Tatsache, dass sich bei nicht immunisierten Tg4-42-Mäusen die Mikrogliaaktivität erhöht, obwohl in diesem Modell keinerlei Plaques zu beobachten sind. So scheint ein direkter Zusammenhang zwischen intraneuronaler A β -Akkumulation und Mikrogliaaktivität zu bestehen.

4.3 Der Einfluss von N-trunkiertem A β_{4-42} und A β_{pE3-42} auf die Neuronenzahl der CA1-Region des Hippocampus in einem neuartigen transgenen Mausmodell

Um gezielt die toxischen Eigenschaften zweier an der Alzheimer-Pathologie maßgeblich beteiligten - hier im Besonderen die N-trunkierten und teils modifizierten Peptide A β_{4-42} und A β_{pE3-42} - untersuchen zu können, wurden Mausmodelle wie das TBA2 (Wirhth et al. 2009), TBA2.1/2.2 (Alexandru et al. 2011) TBA42 (Wittnam et al. 2012) und Tg4-42-Mausmodell (Bouter et al. 2013) entwickelt. TBA2, TBA2.1/2.2 und TBA42 Mäuse exprimieren das an Position 3 des N-Terminus der Aminosäurekette von Glutamat (A β_{3E}) zu Glutamin (A β_{3Q}) mutierte A β_{3Q-42} , welches darauf durch das Enzym Glutamyl-Zyklase in toxisches Pyroglutamat A β_{pE3-42} zyklisiert wird (Schilling et al. 2006). Daraus resultierend zeigen diese Mäuse eine rapide fortschreitende alzheimerartige Verhaltenspathologie und einer damit einhergehenden A β - und A β_{pE-x} -Ansammlung in Kombination mit Neuronenverlust, Mikrogliose und Astrozytose. Bereits im Alter von 3 Monaten konnte intraneurales Abeta im Hippocampus von TBA42-Mäusen gefunden werden; im Alter von 6 Monaten darüber hinaus auch in zerebellären Kerngebieten. Extrazelluläre A β -

Ablagerungen fehlten hingegen weitestgehend in allen untersuchten Altersgruppen (Wittnam et al. 2012; Meißner et al. 2015).

Der Einfluss von N-trunkiertem $A\beta_{pE3-42}$ (Wirhth et al. 2009; Alexandru et al. 2011; Wittnam et al. 2012) und $A\beta_{4-42}$ (Bouter et al. 2013) in einem Mausmodell als allein vorkommendem Peptid wurde bereits weiter oben beleuchtet. So konnten frühere stereologische Analysen der CA1-Region des Hippocampus bei TBA42-Mäusen einen signifikanten Neuronenverlust ab einem Alter von etwa 12 Monaten aufdecken, wohingegen kein Neuronenverlust im Alter von 3 und 6 Monaten zu beobachten war (Meißner et al. 2015). Im Vergleich dazu zeigten quantitative Analysen der Neuronenzahl des CA1-Bandes bei 8 Monate alten Tg4-42_{hemi}-Tieren einen Neuronenverlust von 38% im Vergleich zum Wildtyp; bei homozygoten Tieren desselben Alters war dieser mit 66% sogar noch stärker ausgeprägt. Im Alter von 12 Monaten zeigten hemizygoten Tg4-42-Mäuse eine weitere Abnahme der Neuronenzahl auf 49% im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Tieren (Bouter et al. 2013). Ergänzend zu diesen Untersuchungen fanden Antonios *et al.* heraus, dass der Neuronenverlust bei homozygoten Tg4-42-Mäusen ab etwa einem Alter von 4 Monaten einsetzt (mit 17 % noch nicht signifikant) und in 6 Monate alten Tieren bereits 50% der Neurone der CA1-Region untergegangen sind (Antonios et al. 2015). In beiden Mausmodellen wurden ergänzend dazu Defizite im Bereich des Arbeitsgedächtnisses festgestellt, was die Relevanz dieser beiden $A\beta$ -Formen im Rahmen der Alzheimer-Pathogenese unterstreicht, zumal beide $A\beta$ -Varianten in früheren Studien als Hauptvertreter in Alzheimer-Gehirnen identifiziert (Iwatsubo et al. 1994; Saido et al. 1995; Portelius et al. 2010) und deren toxischen Eigenschaften auch *in vitro* belegt wurden (Bouter et al. 2013). Es stellt sich also die Frage, welche Effekte diese beiden Peptide in Kombination *in vivo* zeigen. Deshalb wurde ein neuartiges transgenes Mausmodell, das Bigen-Mausmodell, entwickelt, welches diese Frage genauer beleuchten soll. Dabei wurden bigene Mäuse durch Kreuzung von positiv-transgenen TBA42- und Tg4-42-Mäusen erzeugt (Lopez-Noguerola et al. 2018). Im Bigen-Mausmodell, gekennzeichnet durch die Ko-Expression von $A\beta_{pE3-42}$ und $A\beta_{4-42}$, konnten bis dato charakteristische alzheimerartige Merkmale wie bspw. schwere Neuronenverluste in der CA1-Region und stark ausgeprägte motorische Defizite beobachtet werden. Neurofibrillenbündel und extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen jedoch fehlen (Lopez-Noguerola et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden die Neuronenzahlen in der CA1-Region von hemi- und homozygoten TBA42- und Tg4-42-Mäusen zum Zeitpunkt von 3 und 6 Monaten mit den Neuronenzahlen gleichaltriger bigener Mäuse verglichen. So zeigten bigene Mäuse in beiden Altersgruppen hochsignifikante Unterschiede in der Neuronenzahl im Vergleich zu allen anderen untersuchten Gruppen. Bezogen auf die Gruppe der Wildtyp-Tiere betrug der Verlust bei 3 Monate alten Bigenen etwa 42%. Im Alter von 6 Monaten nahm die Zahl der Nervenzellen nochmals weiter bis auf 47% ab, was vermuten lässt, dass ungefähr ab dem 6. Monat ein Plateau erreicht wird und sich der Nervenzellverlust ab diesem Zeitpunkt nicht wesentlich weiter ausprägen wird. Weitere Analysen zu späteren Zeitpunkten könnten

dazu ergänzt werden. Daneben nahmen sowohl die Nervenzellen bei den Tg4-42_{hom}-Mäusen untereinander als auch verglichen mit den bigenen Tieren im Alter ab. Diese Beobachtung lässt auf einen alters- und genotypabhängigen Effekt, resultierend aus der Kombination beider Peptide, schließen. Welche Mechanismen zu der deutlich stärker ausgeprägten Pathologie führen, kann nur vermutet werden. Einige Studien zeigten, dass eine Modifizierung des N-Terminus zu Pyroglutamat eine Spaltung durch die meisten Aminopeptidasen einschränkt und damit die toxischen Eigenschaften dieser Peptide erhöht (Schlenzig et al. 2009; Sofola-Adesakin et al. 2016). Außerdem wurde jüngst von Dammers *et al.* das Aggregationsverhalten von A β _{pE3-42} mit A β ₁₋₄₂ untersucht. Zunächst fanden sie heraus, dass sich A β ₁₋₄₂ in langen dünnen Ketten verzweigt, wohingegen A β _{pE3-42}-Fibrillen im Durchschnitt wesentlich kürzere Aggregate bilden. Außerdem demonstrierten sie, dass A β _{pE3-42}-Monomere die primäre Zusammenlagerung von A β ₁₋₄₂ erhöhen und A β _{pE3-42}-Fibrillen eine gute Vorlage für die Verlängerung von A β ₁₋₄₂-Fibrillen darstellen (Dammers et al. 2017). Ob solche Beobachtungen jedoch auch auf die beiden N-trunkierten A β _{pE3-42} und A β ₄₋₄₂ übertragbar sind, ist nicht klar. Weitere Studien zum Zusammenspiel dieser A β -Isoformen untereinander könnten helfen, den Pathomechanismus besser zu verstehen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass neurodegenerative Prozesse, so auch der Neuronenverlust, durch die Ko-Expression der beiden N-trunkierten A β -Varianten A β _{pE3-42} und A β ₄₋₄₂ im Vergleich zu den beiden homozygoten Vergleichsgruppen deutlich stärker ausgeprägt war und somit die Rolle N-trunkierter A β -Isoformen in der Alzheimer-Pathogenese weiter bekräftigt.

5 Ausblick

Das bisherige Wissen über den Einfluss N-trunkierter A β -Varianten und die in dieser Arbeit ergänzenden Beobachtungen festigen in Zusammenschau weiter die Relevanz der beiden A β -Isoformen im Bereich der Alzheimer-Pathogenese. So könnten in Zukunft gerade diese besonders toxischen A β -Varianten als mögliche Zielstrukturen für eine spezifischere Immuntherapie anvisiert werden.

Bereits in der Vergangenheit gab es eine Vielzahl von Untersuchungen im Zusammenhang mit aktiver und passiver Immunisierung als präventive Maßnahmen im Kampf gegen die Alzheimer-Krankheit (Schenk et al. 1999; Das et al. 2001; Serrano-Pozo et al. 2010). Auch wenn einige Hoffnungsträger wie Bapineuzumab oder Solanezumab in klinischen-Phase-III-Studien noch nicht überzeugen konnten (Eli Lilly and Company 2016; Vandenberghe et al. 2016), sollten die Ergebnisse nicht als Fehlschlag interpretiert werden, sondern zeigen vielmehr, dass die Pathomechanismen, die zum Progress der Alzheimer-Krankheit führen, noch nicht vollends verstanden sind. So können aus diesen Ergebnissen auch wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die für die weiterführende Forschungsarbeit von Bedeutung sein können. Es fiel beispielsweise bei einer gepoolten Analyse der aus den beiden Phase-III-Studien, EXPEDITION 1 und 2 von Solanezumab gewonnenen Ergebnissen auf, dass bei Patienten durch Behandlung mit Solanezumab im präklinischen Stadium eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit um ca. 34% zu beobachten war, jedoch nicht bei Patienten mit moderater oder schwerer kognitiver Beeinträchtigung (Siemers et al. 2016). Diese Tatsache macht deutlich, dass eine Immuntherapie effektiver sein könnte, wenn sie denn nur früh genug im Krankheitsverlauf eingesetzt werden würde (Toyn 2015).

Im Zusammenhang mit den bisher fehlgeschlagenen Studien könnte auch die Spezifität der Antikörper diskutiert werden. Die Zielstrukturen von Solanezumab und Bapineuzumab sind dabei eher unspezifisch. So richtet sich Solanezumab gegen ein internes Epitop im A β -Peptid (Aminosäuren der Positionen 13-28) und Bapineuzumab gegen die Anfangssequenz der Vollängenpeptide (Aminosäuren der Positionen 1-5 des N-Terminus) (Spencer und Masliah 2014). Beide Antikörper erkennen und eliminieren also relativ ungerichtet eine Vielzahl von A β -Isoformen, ungeachtet ihrer protektiven oder potentiell toxischen Eigenschaften. Eine spezifischere Antigenaffinität der verwendbaren Antikörper könnte dabei nur die Peptide angreifen, die nach jetzigem Wissensstand auch tatsächlich in den Pathomechanismus eingebunden sind; so auch zum Beispiel der spezifisch gegen toxische N-trunkierte A β -Varianten gerichtete Antikörper NT4X (Antonios et al. 2013).

Neben einem geeigneten Behandlungszeitpunkt und einer höheren Spezifität des Antikörpers leistet auch die im ZNS verfügbare Menge des Antikörpers einen

entscheidenden Beitrag zu einer erfolgreichen Immuntherapie. Bislang wird geschätzt, dass nur etwa 0,1% der peripher injizierten Antikörper-Dosis überhaupt die Blut-Hirn-Schranke passiert; der Rest wird über Leber und Nieren metabolisiert und ausgeschieden (Banks et al. 2002; Spencer und Masliah 2014). Die Blut-Hirn-Schranke dient physiologischerweise der Aufrechterhaltung eines schützenden Milieus für neuronale Strukturen. Sie reguliert dazu selektiv den Transport von Elektrolyten, Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Zellen und somit auch den Verkehr hochmolekularer Substanzen, so auch Antikörper (Daneman und Prat 2015). Interaktionen mit Rezeptoren auf den Endothelzellen, die am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, werden schon seit vielen Jahren erfolgreich zur „Einschleusung“ höhermolekularer Substanzen auf die neuronale Seite verwendet (Spencer und Masliah 2014). Ein Beispiel dafür ist ein Transferrin-Rezeptor, der effizient den Transport bestimmter Medikamente und Proteine über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt (Boado et al. 2007). Dieser Mechanismus wird nun auch seit einigen Jahren erforscht, um die Immuntherapie für die Alzheimer-Krankheit effizienter zu gestalten (Yu et al. 2011; Bien-Ly et al. 2014).

Es kann also resümiert werden, dass mit den bis dato gemachten Erfahrungen in der Immuntherapie mit verschiedensten anti-A β -Antikörpern viele Aspekte einer Optimierung der Alzheimer-Therapie erreicht werden können. Besonders im Hinblick auf eine spezifischere Immuntherapie stellt der Antikörper NT4X eine durchaus vielversprechende Möglichkeit in der Therapie des Morbus Alzheimer dar. Ein ganzheitliches Behandlungskonzept bestehend aus Prävention, Früherkennung und leitliniengerechter Versorgung könnte so in Zukunft um die Option einer spezifischen Immuntherapie ergänzt werden.

6 Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit ist eine stetig fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die in Form extrazellulärer Amyloid-Ablagerungen, intrazellulärer Tau-fibrillen und Nervenzellverlust in Erscheinung tritt. Die N-trunkierten A β -Varianten, A β ₄₋₄₂ und das am Amino-Terminus zusätzlich modifizierte A β _{pE3-42}, gehören neben den Volllängenpeptiden A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ zu den am häufigsten vorkommenden Isoformen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten. N-trunkierte A β -Varianten zeigen bei *in-vitro*-Analysen im Vergleich zu den Volllängenpeptiden ein deutlich erhöhtes Aggregationsbestreben und eine verstärkte Neurotoxizität. Auch *in vivo* können neurotoxische und neurodegenerative Effekte beobachtet werden. Tg4-42-Mäuse exprimieren ausschließlich humanes A β ₄₋₄₂, ohne dabei eine Tau- oder Plaque-Pathologie zu entwickeln. Bei diesen Mäusen korreliert das Maß einer stetig abnehmenden intraneuronalen A β -Expression mit einem in der CA1-Region des Hippocampus zu beobachtenden Nervenzellverlust. Außerdem bewirkt die chronische Belastung von A β ₄₋₄₂ deutliche Defizite im räumlichen Arbeitsgedächtnis. Auch TBA42-Mäuse, die ausschließlich A β _{pE3-42} exprimieren, zeigen eine rapide fortschreitende alzheimerartige Verhaltenspathologie mit damit einhergehendem Neuronenverlust im Hippocampus.

In der vorliegenden Arbeit konnten - ergänzend zu vorangegangenen Analysen - weitere Daten zum Tg4-42-Mausmodell gesammelt werden. Neben einer A β -Expression in der CA1-Region des Hippocampus wurde mittels DAB-Immunhistochemie eine A β -Expression im Striatum und piriformen Kortex nachgewiesen. Die stereologische Auswertung der Neuronenzahl der CA1-Region bei 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Mäusen zeigte dabei einen signifikanten Neuronenverlust von -38 % im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu ergaben die Analysen von Striatum und piriformem Kortex keine Unterschiede in den Zellzahlen bei selbigen. Darüber hinaus wurde die Aktivität von Mikrogliazellen mit und ohne Behandlung mit NT4X, einem für N-trunkierte A β -Peptide spezifischen Antikörper, im Bereich des Kortex von 6 Monate alten Tg4-42_{hom}-Tieren untersucht. Dabei zeigte sich in der DAB-Immunhistochemie ein signifikanter Behandlungseffekt durch NT4X. Wohingegen die Aktivität der Mikroglia bei unbehandelten Tieren um +34% anstieg, konnte eine passive Immunisierung mit NT4X die Mikrogliose um -32% senken. Dementsprechend wurde durch die Behandlung mit NT4X ein bei den Wildtyp-Tieren als „normal“ angenommenes Niveau aktivierter Mikrogliazellen erreicht.

Das neuartig generierte Mausmodell, das Bigen-Mausmodell, erlaubt erstmals genaue Analysen der Effekte einer Ko-Expression von A β ₄₋₄₂ und A β _{pE3-42}. Bigene Mäuse zeigen neben ausgeprägten sensomotorischen Defiziten, die mit einer Akkumulation von intra- und extrazellulären Amyloid-Ansammlungen im Rückenmark korrelieren, eine deutliche

Reduktion des Angstverhaltens. Ergänzend dazu konnten in dieser Arbeit erstmalig die Effekte beider A β -Peptide auf die Neuronenzahl im Hippocampus untersucht werden. Dazu wurden kresylviolett gefärbte Präparate mittels Design-basierter Stereologie ausgewertet. Es wurden die Zellzahlen der CA1-Region von homo- und hemizygoten Tg4-42- und TBA42-Mäusen mit den Zellzahlen von Bigenen im Alter von 3 und 6 Monaten verglichen. Dabei zeigte sich ein signifikanter alters- und genotypabhängiger Neuronenverlust im CA1-Band bei bigenen Tieren. Im Alter von 3 Monaten nahm die Nervenzellzahl bei den Bigenen um -42% verglichen mit der Wildtyp-Gruppe ab. Im Alter von 6 Monaten war die Reduktion der Zellzahl in der CA1-Region bei bigenen Tieren auf -47% im Vergleich zum Wildtyp vorangeschritten. Insgesamt war der Nervenzellverlust sowohl bei 3 als auch bei 6 Monate alten Bigenen stärker ausgeprägt als bei den gleichaltrigen homozygoten (und hemizygoten) Vergleichsgruppen.

In Zusammenschau der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse kann also abschließend festgehalten werden, dass N-trunkierte A β -Varianten, ob nun alleine für sich betrachtet oder in Ko-Expression, deutliche toxische Eigenschaften aufweisen und eine entscheidende Rolle im Rahmen der Alzheimer-Krankheit spielen. Umso mehr könnten die untersuchten A β -Peptide auch als Zielstruktur für mögliche Therapieansätze bei der Alzheimer-Krankheit anvisiert werden.

7 Literaturverzeichnis

Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, Pfeiffer E, Sano M, Davis KL, Farlow MR, Jin S, Thomas RG, Thal LJ, Alzheimer's Disease Cooperative Study (2003): Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *JAMA* 289, 2819–2826

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

Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Becker A, Bäuscher C, Kohlmann S, Sedlmeier R, Raber KA, Cynis H, Rönicke R, et al. (2011): Selective Hippocampal Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Small Amounts of Truncated A β Is Induced by Pyroglutamate–A β Formation. *J Neurosci* 31, 12790–12801

Allen Institute (2015) <http://atlas.brainmap.org/atlas?atlas=602630314#atlas=602630314&plate=576989940&structure=549&x=5279.83544193097&y=3743.75291511194&zoom=-3&resolution=11.93&z=3>; Zugriff am 01.05.2018

Allinson TMJ, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003): ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci* 23, 342–352

Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996): Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2, 783–787

Alzheimer's Association. https://www.alz.org/alzheimers_disease_diagnosis.asp; Zugriff am 25.01.2018a

Alzheimer's Association. https://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp; Zugriff am 25.01.2018b

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>; Zugriff am 05.01.2018

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
- Bacon AW, Bondi MW, Salmon DP, Murphy C (1998): Very early changes in olfactory functioning due to Alzheimer's disease and the role of apolipoprotein E in olfaction. *Ann N Y Acad Sci* 855, 723–731
- Banks WA, Terrell B, Farr SA, Robinson SM, Nonaka N, Morley JE (2002): Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. *Peptides* 23, 2223–2226
- Barker WW, Luis CA, Kashuba A, Luis M, Harwood DG, Loewenstein D, Waters C, Jimison P, Shepherd E, Sevush S, et al. (2002): Relative frequencies of Alzheimer disease, Lewy body, vascular and frontotemporal dementia, and hippocampal sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16, 203–212
- Bayer TA, Wirths O (2014): Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 127, 787–801
- Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ (2012): Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cell Signal* 24, 402–409
- Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012): The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15, 349–357
- Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horré K, Wiltfang J, Esselmann H, De Strooper B (2006): Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 96, 732–742
- Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2013): Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 12, 92–104
- Bien J, Jefferson T, Čaušević M, Jumpertz T, Munter L, Multhaup G, Weggen S, Becker-Pauly C, Pietrzik CU (2012): The Metalloprotease Mepripin β Generates Amino Terminal-truncated Amyloid β Peptide Species. *J Biol Chem* 287, 33304–33313
- Bien-Ly N, Yu YJ, Bumbaca D, Elstrott J, Boswell CA, Zhang Y, Luk W, Lu Y, Dennis MS, Weimer RM, et al. (2014): Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants. *J Exp Med* 211, 233–244
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McLaugh JL, LaFerla FM (2005): Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006): Alzheimer's disease. *Lancet* 368, 387–403
- Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y, Pardridge WM (2007): Genetic engineering, expression,

and activity of a fusion protein of a human neurotrophin and a molecular Trojan horse for delivery across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng* 97, 1376–1386

Bottino CMC, Castro CC, Gomes RLE, Buchpiguel CA, Marchetti RL, Neto MRL (2002): Volumetric MRI measurements can differentiate Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and normal aging. *Int Psychogeriatr* 14, 59–72

Bouter Y, Dietrich K, Wittnam JL, Rezaei-Ghaleh N, Pillot T, Papot-Couturier S, Lefebvre T, Sprenger F, Wirths O, Zweckstetter M, Bayer TA (2013): N-truncated amyloid 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 GAN, Parker MW, Wiltfang J, Miles LA, Bayer TA (2015): Abeta targets of the biosimilar antibodies of Bapineuzumab, Crenezumab, Solanezumab in comparison to an antibody against 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

Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004): Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14515–14520

Busch C, Bohl J, Ohm TG (1997): Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging* 18, 401–406

Cacace R, Slegers K, Broeckhoven CV (2016): Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement* 12, 733–748

Carrillo-Mora P, Luna R, Colín-Barenque L (2014): Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid Med Cell Longev* 2014, 795375

Casas C, Sergeant N, Itier J-M, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, et al. (2004): Massive CA1/2 Neuronal Loss with Intraneuronal and N-Terminal Truncated A β 42 Accumulation in a Novel Alzheimer Transgenic Model. *Am J Pathol* 165, 1289–1300

Chapuis J, Cohen Y, He X, Zhang Z, Jin S, Xu F, Wilson DA (2013): Lateral Entorhinal Modulation of Piriform Cortical Activity and Fine Odor Discrimination. *J Neurosci* 33, 13449–13459

Chasseigneaux S, Allinquant B (2012): Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem* 120 Suppl 1, 99–108

- Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O (2010): Intracellular A β triggers neuron loss in the cholinergic system of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31, 1153–1163
- Colacurcio DJ, Pensalfini A, Jiang Y, Nixon RA (2017): Dysfunction of Autophagy and Endosomal-lysosomal Pathways: Roles in Pathogenesis of Down Syndrome and Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med*, 114, 40-51
- 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
- Coronel R, Bernabeu-Zornoza A, Palmer C, Muñiz-Moreno M, Zambrano A, Cano E, Liste I (2018): Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Mol Neurobiol*, 2018 Jan 30 Epub ahead of print, 1-11
- Cynis H, Schilling S, Bodnár M, Hoffmann T, Heiser U, Saido TC, Demuth H-U (2006): Inhibition of glutaminy cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1764, 1618–1625
- Dammers C, Schwarten M, Buell AK, Willbold D (2017): Pyroglutamate-modified A β (3-42) affects aggregation kinetics of A β (1-42) by accelerating primary and secondary pathways. *Chem Sci* 8, 4996–5004
- Daneman R, Prat A (2015): The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020412
- Das P, Murphy MP, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE (2001): Reduced effectiveness of Abeta1-42 immunization in APP transgenic mice with significant amyloid deposition. *Neurobiol Aging* 22, 721–727
- Delaère P, Duyckaerts C, Masters C, Beyreuther K, Piette F, Hauw JJ (1990): Large amounts of neocortical beta A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neurosci Lett* 116, 87–93
- Demars MP, Bartholomew A, Strakova Z, Lazarov O (2011): Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin. *Stem Cell Res* 2, 36
- de Oliveira FF, Bertolucci PHF, Chen ES, Smith MC (2014): Assessment of risk factors for earlier onset of sporadic Alzheimer's disease dementia. *Neurol India* 62, 625–630
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. - Die Häufigkeiten von Demenzerkrankungen - Infoblatt 2016. https://www.deutschealzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt_1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf; Zugriff am 28.12.2017
- DGPPN/DGN (Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde/ Deutsche Gesellschaft für Neurologie) S3-

Leitlinie 2016 Demenzen - Langversion. 2016

D'Hooge R, De Deyn PP (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 36, 60–90

Dickson DW, Crystal HA, Mattiace LA, Masur DM, Blau AD, Davies P, Yen SH, Aronson MK (1992): Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging* 13, 179–189

Doty RL, Reyes PF, Gregor T (1987): Presence of both odor identification and detection deficits in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 18, 597–600

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

Duncombe J, Kitamura A, Hase Y, Ihara M, Kalaria RN, Horsburgh K (2017): Chronic cerebral hypoperfusion: a key mechanism leading to vascular cognitive impairment and dementia. Closing the translational gap between rodent models and human vascular cognitive impairment and dementia. *Clin Sci* 131, 2451–2468

Duyckaerts C, Delatour B, Potier M-C (2009): Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118, 5–36

Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Müller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K (1988): Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7, 949–957

Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, et al. (1997): A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 6, 2087–2089

Eimer WA, Vassar R (2013): Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A β 42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener* 8, 2

Eli Lilly and Company. <https://www.prnewswire.com/news-releases/lilly-announces-top-line-results-of-solanezumab-phase-3-clinical-trial-300367976.html>; Zugriff am 03.03.2018

Esposito LA (2011): Measuring APP carboxy-terminal fragments. *Methods Mol Biol NJ* 670, 71–84

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

- Fillit H, Ding WH, Buee L, Kalman J, Altstiel L, Lawlor B, Wolf-Klein G (1991): Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 129, 318–320
- 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
- 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, Eckman CB, Younkin SG (2000): Biochemical detection of A β isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 172–187
- 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 A β 42 Accumulation in Human Brain. *Am J Pathol* 156, 15–20
- Graves AB, Bowen JD, Rajaram L, McCormick WC, McCurry SM, Schellenberg GD, Larson EB (1999): Impaired olfaction as a marker for cognitive decline: interaction with apolipoprotein E epsilon4 status. *Neurology* 53, 1480–1487
- Grundman M, Petersen RC, Ferris SH, Thomas RG, Aisen PS, Bennett DA, Foster NL, Jack CR, 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
- Güntert A, Döbeli H, Bohrmann B (2006): High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143, 461–475
- 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
- Hardy J, Allsop D (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12, 383–388
- Hardy JA, Higgins GA (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185
- Haupt C, Leppert J, Rönicke R, Meinhardt J, Yadav JK, Ramachandran R, Ohlenschläger O, Reymann KG, Görlach M, Fändrich M (2012): Structural basis of β -

amyloid-dependent synaptic dysfunctions. *Angew Chem* 51, 1576–1579

He W, Barrow CJ (1999): The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* 38, 10871–10877

Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, et al. (2008): Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372, 216–223

Holtzman DM, John CM, Goate A (2011): Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. *Sci Transl Med* 3, 77sr1

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

Hüll M, Fiebich BL, Schumann G, Lieb K, Bauer J (1999): Anti-inflammatory substances - a new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discov Today* 4, 275–282

Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, et al. (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14, 419–427

Hutton M, Pérez-Tur J, Hardy J (1998): Genetics of Alzheimer's disease. *Essays Biochem* 33, 117–131

Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT (1997): APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 965–973

Ishizuka K, Kimura T, Igata-yi R, Katsuragi S, Takamatsu J, Miyakawa T (1997): Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 51, 135–138

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001): Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292, 1550–1552

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994): Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45–53

Jarmolowicz AI, Chen H-Y, Panegyres PK (2015): The Patterns of Inheritance in Early-Onset Dementia. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 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

Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, Graham LC, Bemiller S, Broihier ML, Xu G, Margevicius D, Karlo JC, Sousa GL, et al. (2015): TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* 212, 287–295

Josephs KA, Whitwell JL, Ahmed Z, Shiung MM, Weigand SD, Knopman DS, Boeve BF, Parisi JE, Petersen RC, Dickson DW, Jack CR (2008): Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann Neurol* 63, 204–212

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

Kang JM, Lee S-Y, Seo S, Jeong HJ, Woo S-H, Lee H, Lee Y-B, Yeon BK, Shin DH, Park KH, et al. (2017): Tau positron emission tomography using [18F]THK5351 and cerebral glucose hypometabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 59, 210–219

Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1992): Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem* 59, 750–753

Kivipelto M, Helkala E-L, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (2001): Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447–1451

Klein WL (2002): A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41, 345–352

Krause DL, Müller N (2010): Neuroinflammation, microglia and implications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* 2010

Kril JJ, Hodges J, Halliday G (2004): Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 361, 9–12

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

Kummer MP, Heneka MT (2014): Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther* 6, 28

- Lannfelt L, Möller C, Basun H, Osswald G, Sehlin D, Satlin A, Logovinsky V, Gellerfors P (2014): Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid- β protofibrils - a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 6, 16
- Lautenschlager N, Kurz A, Müller U (1999): Erbliche Ursachen und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit. *Nervenarzt* 70, 195–205
- Lee AS, Duman RS, Pittenger C (2008): A double dissociation revealing bidirectional competition between striatum and hippocampus during learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17163–17168
- 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
- Leitlinie Demenzen s. DGPPN/DGN S3-Leitlinie 2016
- 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
- Lexikon der Neurowissenschaft. <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/nissl-faerbung/8831>; Zugriff am 04.01.2018
- Li J, Wang YJ, Zhang M, Xu ZQ, Gao CY, Fang CQ, Yan JC, Zhou HD, Chongqing Ageing Study Group (2011): Vascular risk factors promote conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology* 76, 1485–1491
- Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J (2000): Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1456–1460
- Lindroos R, Dorst MC, Du K, Filipović M, Keller D, Ketzef M, Kozlov AK, Kumar A, Lindahl M, Nair AG, et al. (2018): Basal Ganglia Neuromodulation Over Multiple Temporal and Structural Scales-Simulations of Direct Pathway MSNs Investigate the Fast Onset of Dopaminergic Effects and Predict the Role of Kv4.2. *Front Neural Circuits* 12, 3
- Lopez-Noguerola JS, Giessen NME, Ueberück M, Meißner JN, Pelgrim C, Adams J, Wirths O, Bouter Y, Bayer TA (2018): Synergistic effect on neurodegeneration by N-truncated A β 4-42 and pyroglutamate A β 3-42 in a mouse model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 10, 64
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985): Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4245–4249
- Masurkar AV, Devanand DP (2014): Olfactory Dysfunction in the Elderly: Basic

Circuitry and Alterations with Normal Aging and Alzheimer's Disease. *Curr Geriatr Rep* 3, 91–100

Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, Irizarry MC, Hyman BT (2007): Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1161, 116–123

Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Scheff SW, Christakos S (1995): Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res* 42, 357–370

Mayeux R, Stern Y (2012): Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006239

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

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984): Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, et al. (2011): The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7, 263–269

Meißner JN, Bouter Y, Bayer TA (2015): Neuron Loss and Behavioral Deficits in the TBA42 Mouse Model Expressing N-Truncated Pyroglutamate Amyloid-β3-42. *J Alzheimers Dis* 45, 471–482

Montgomery KS, Simmons RK, Edwards G, Nicolle MM, Gluck MA, Myers CE, Bizon JL (2011): Novel age-dependent learning deficits in a mouse model of Alzheimer's disease: implications for translational research. *Neurobiol Aging* 32, 1273–1285

Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguchi H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA (2002): Intraneuronal Aβ42 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

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

Morrison JH, Hof PR (1997): Life and death of neurons in the aging brain. *Science* 278, 412–419

Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG (1995): Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9697–9701

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992): A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1, 345–347

Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Eldik LV, et al. (2006): Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci* 26, 10129–10140

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421

Packard MG, Knowlton BJ (2002): Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25, 563–593

Panegyres PK, Atkins ER (2011): The Functions of the Amyloid Precursor Protein Gene and Its Derivative Peptides: I Molecular Biology and Metabolic Processing. *Neurosci Med* 02, 120

Pangalos MN, Shioi J, Robakis NK (1995): Expression of the chondroitin sulfate proteoglycans of amyloid precursor (appican) and amyloid precursor-like protein 2. *J Neurochem* 65, 762–769

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung W-Y, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al. (1991): Linkage studies in familial Alzheimer disease: Evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet* 48, 1034–1050

Pike CJ, Overman MJ, Cotman CW (1995): Amino-terminal Deletions Enhance Aggregation of β -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

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

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

Rochet JC, Lansbury PT (2000): Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* 10, 60–68

Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T (1995): Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775–778

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, et al. (2006): APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38, 24–26

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

Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C (2017): Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Ann Neurosci* 24, 46–54

Sandebring A, Welander H, Winblad B, Graff C, Tjernberg LO (2013): The Pathogenic A β 43 Is Enriched in Familial and Sporadic Alzheimer Disease. *PLoS ONE* 8, e55847

Schafer DP, Stevens B (2015): Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020545

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, et al. (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177

Schilling S, Lauber T, Schaupp M, Manhart S, Scheel E, Böhm G, Demuth H-U (2006): On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45, 12393–12399

Schlenzig D, Manhart S, Cinar Y, Kleinschmidt M, Hause G, Willbold D, Funke SA, Schilling S, Demuth H-U (2009): Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* 48, 7072–7078

Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813–831

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, Hardy J (2016): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8, 595–608

- Serrano-Pozo A, William CM, Ferrer I, Uro-Coste E, Delisle M-B, Maurage C-A, Hock C, Nitsch RM, Masliah E, Growdon JH, et al. (2010): Beneficial effect of human anti-amyloid- β active immunization on neurite morphology and tau pathology. *Brain* 133, 1312–1327
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007): Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J Neurosci* 27, 2866–2875
- Siemers ER, Sundell KL, Carlson C, Case M, Sethuraman G, Liu-Seifert H, Dowsett SA, Pontecorvo MJ, Dean RA, Demattos R (2016): Phase 3 solanezumab trials: Secondary outcomes in mild Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement* 12, 110–120
- Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL (1993): Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 13, 3136–3142
- Smith EE, Greenberg SM (2009): Beta-amyloid, blood vessels, and brain function. *Stroke* 40, 2601–2606
- Sofola-Adesakin O, Khericha M, Snoeren I, Tsuda L, Partridge L (2016): pGluA β increases accumulation of A β in vivo and exacerbates its toxicity. *Acta Neuropathol* 4, 109
- Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, West BL, Green KN (2016): Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain* 139, 1265–1281
- Spencer B, Masliah E (2014): Immunotherapy for Alzheimer's disease: past, present and future. *Front Aging Neurosci* 6, 114
- Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, 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
- Tabert MH, Liu X, Doty RL, Serby M, Zamora D, Pelton GH, Marder K, Albers MW, Stern Y, Devanand DP (2005): A 10-item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 58, 155–160
- Tabet N, Feldman H (2003): Ibuprofen for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD004031
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL (1987): Amyloid beta protein gene: cDNA,

mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880–884

ter Laak HJ, Renkawek K, van Workum FP (1994): The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 8, 38–48

Terry AV, Buccafusco JJ (2003): The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 821–827

Thal DR, Walter J, Saidu TC, Fändrich M (2015): Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 129, 167–182

Toledo JB, Arnold SE, Raible K, Brettschneider J, Xie SX, Grossman M, Monsell SE, Kukull WA, Trojanowski JQ (2013): Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain* 136, 2697–2706

Tolppanen A-M, Taipale H, Hartikainen S (2017): Head or brain injuries and Alzheimer's disease: A nested case-control register study. *Alzheimers Dement* 13, 1371-1379

Toyn J (2015): What lessons can be learned from failed Alzheimer's disease trials? *Expert Rev Clin Pharmacol* 8, 267–269

Trepel M: Neuroanatomie - Struktur und Funktion. 5. Auflage 2012; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, Hamburg-Eppendorf 2012

van der Kant R, Goldstein LSB (2015): Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell* 32, 502–515

Van Dijck A, Vloeberghs E, Van Dam D, Staufenbiel M, De Deyn PP (2008): Evaluation of the APP23-model for Alzheimer's disease in the odour paired-associate test for hippocampus-dependent memory. *Behav Brain Res* 190, 147–151

Van Eldik LJ, Carrillo MC, Cole PE, Feuerbach D, Greenberg BD, Hendrix JA, Kennedy M, Kozauer N, Margolin RA, Molinuevo JL, et al. (2016): The roles of inflammation and immune mechanisms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2, 99–109

Vandenberghe R, Rinne JO, Boada M, Katayama S, Scheltens P, Vellas B, Tuchman M, Gass A, Fiebich JB, Hill D, et al. (2016): Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. *Alzheimers Res Ther* 8, 18

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, et al. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741

- Vereecken TH, Vogels OJ, Nieuwenhuys R (1994): Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15, 45–54
- Vinters HV, Vonsattel J-PG (2000): Neuropathologic Features and Grading of Alzheimer-Related and Sporadic CAA. *Cerebral Amyloid Angiopathy in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. Dordrecht 2000 137–155
- Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP (1990): Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11, 3–13
- Wada H, Nakajoh K, Satoh-Nakagawa T, Suzuki T, Ohrui T, Arai H, Sasaki H (2001): Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 47, 271–276
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007): A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101, 1172–1184
- Webster SJ, Bachstetter AD, Van Eldik LJ (2013): Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5, 28
- Weiner MW, Crane PK, Montine TJ, Bennett DA, Veitch DP (2017): Traumatic brain injury may not increase the risk of Alzheimer disease. *Neurology* 3, 177-188
- 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
- Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA (2010): Olfactory Dysfunction Correlates with Amyloid- β Burden in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Neurosci* 30, 505–514
- 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
- White NM, McDonald RJ (2002): Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77, 125–184
- Whitwell JL, Josephs KA, Murray ME, Kantarci K, Przybelski SA, Weigand SD, Vemuri P, Senjem ML, Parisi JE, Knopman DS, et al. (2008): MRI correlates of

neurofibrillary tangle pathology at autopsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 71, 743–749

Wirth M, Bejanin A, La Joie R, Arenaza-Urquijo EM, Gonneaud J, Landeau B, Perrotin A, Mézange F, de La Sayette V, Desgranges B, Chételat G (2017): Regional patterns of gray matter volume, hypometabolism, and beta-amyloid in groups at risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 63, 140-151

Wirhth O, Multhaup G, Bayer TA (2004): A modified β -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the β -amyloid peptide – the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91, 513–520

Wirhth O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth H-U, Bayer TA (2009): Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3–42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118, 487–496

Wirhth O, Bethge T, Marcello A, Harmeier A, Jawhar S, Lucassen PJ, Multhaup G, Brody DL, Esparza T, Ingelsson M, et al. (2010): Pyroglutamate Abeta pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm* 117, 85–96

Wittnam JL, Portelius E, Zetterberg H, Gustavsson MK, Schilling S, Koch B, Demuth H-U, Blennow K, Wirhth O, Bayer TA (2012): Pyroglutamate Amyloid β ($A\beta$) Aggravates Behavioral Deficits in Transgenic Amyloid Mouse Model for Alzheimer Disease. *J Biol Chem* 287, 8154–8162

Xiao H, Gao Y, Liu L, Li Y (2017): Association between polymorphisms in the promoter region of the apolipoprotein E (APOE) gene and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *EXCLI J* 16, 921–938

Yan R (2017): Physiological Functions of the β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2. *Front Mol Neurosci* 10, 97

Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, et al. (1999): Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537

Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, Atwal J, Elliott JM, Prabhu S, Watts RJ, Dennis MS (2011): Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci Transl Med* 3, 84ra44

Zakzanis KK, Graham SJ, Campbell Z (2003): A meta-analysis of structural and functional brain imaging in dementia of the Alzheimer's type: a neuroimaging profile. *Neuropsychol Rev* 13, 1–18

Zheng H, Koo EH (2006): The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5

Zhuo J-M, Prakasam A, Murray ME, Zhang H-Y, Baxter MG, Sambamurti K, Nicolle

MM (2008): An increase in Abeta42 in the prefrontal cortex is associated with a reversal-learning impairment in Alzheimer's disease model Tg2576 APPsw mice. *Curr Alzheimer Res* 5, 385–391

Zis P, Strydom A (2017): Clinical aspects and biomarkers of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Free Radic Biol Med* 114, 3-9

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank Herrn Prof. Dr. Thomas A. Bayer aussprechen, der es mir nicht nur ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe mitwirken zu dürfen, sondern mir vielmehr auch die Möglichkeit gab, Einblicke in die naturwissenschaftliche Grundlagenforschung zu erhalten. Vielen Dank für den stetigen Optimismus und die vielen fachlichen Denkanstöße.

In gleicher Weise möchte ich mich auch bei Frau Dr. Yvonne Bouter bedanken, die mich von Beginn an nicht nur mit größter Sorgfalt in die vielseitigen Arbeitsabläufe integrierte, sondern mir darüber hinaus auch in höchster Umsicht und Herzlichkeit mit Rat und Tat bei der Umsetzung meiner Arbeit zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich Herrn apl. Prof. Dr. Oliver Wirths danken, der mir bei fachlichen Fragen kompetent und gerne weitergeholfen hat. Auch danke ich Socrates Lopez-Noguerola für die Vorbereitung und Bereitstellung einiger seiner Präparate und Frau Petra Tucholla für Geduld, Hilfsbereitschaft und organisatorische Umsetzung im Labor.

Zu guter Letzt gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für molekulare Psychiatrie für die herzliche Aufnahme ins Team und das durchweg respektvolle und angenehme Arbeitsklima; insbesondere auch Philipp Henniges und Max Ueberück, die mich mit Witz und Gleichmut im Laboralltag begleiteten.