

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. vet. K. Matiasek

Angefertigt an der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München  
(apl. Prof. Dr. med. M. Blobner)

# **Phänotypische Charakterisierung eines transgenen Mausmodells der Alzheimer-Krankheit unter Bezug auf Alter und Geschlecht**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Diana Fendl  
aus  
Bad Aibling

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Marlon Schneider

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

Den Mäusen dieser Studie gewidmet

"It's the questions we can't answer that teach us the most. They teach us how to think. If you give a man an answer, all he gains is a little fact. But give him a question and he'll look for his own answers."

Patrick Rothfuss

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum .....</b>	<b>2</b>
2.1	Kognition und Verhalten .....	2
2.1.1	Klassifikation verschiedener Gedächtnissysteme .....	3
2.1.2	Lern- und Gedächtnisprozesse .....	5
2.1.3	Verhaltenstests für Tiermodelle .....	8
2.2	Die Alzheimer-Krankheit .....	11
2.2.1	Epidemiologie .....	12
2.2.2	Pathophysiologie .....	13
2.2.2.1	Amyloid-Peptid .....	14
2.2.2.2	Tau-Protein .....	16
2.2.2.3	Entzündungsreaktion .....	17
2.2.2.4	Oxidativer Stress .....	18
2.2.2.5	Veränderung der Neurotransmission .....	19
2.2.2.6	Amyloid-Kaskaden-Hypothese .....	22
2.2.3	Klinisches Bild .....	24
2.2.4	Risikofaktoren .....	25
2.2.5	Besondere Bedeutung des Geschlechts .....	26
2.2.6	Transgene Mausmodelle.....	28
<b>3</b>	<b>Eigene Untersuchungen .....</b>	<b>31</b>
3.1	Zielvorstellung.....	31
3.2	Material und Methoden .....	31
3.2.1	Versuchstiere .....	31
3.2.1.1	Herkunft.....	31
3.2.1.2	Haltungsbedingungen .....	32
3.2.2	Versuchsplan .....	33
3.2.3	Modifizierter Hole-Board-Test.....	34
3.2.3.1	Versuchsaufbau .....	34
3.2.3.2	Versuchsablauf .....	38
3.2.3.3	Untersuchte Parameter .....	39
3.2.4	Probenentnahme .....	41
3.2.5	Western-Blot-Verfahren .....	42
3.2.5.1	Proteinextraktion .....	42
3.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	43
3.2.5.3	Gelelektrophorese.....	44
3.2.5.4	Transfer und Darstellung der Proteine .....	48
3.2.6	Statistische Bewertung der Befunde.....	51
3.3	Ergebnisse .....	52
3.3.1	Mortalität .....	52
3.3.2	Physiologische Parameter.....	54
3.3.2.1	Körpergewicht .....	54
3.3.2.2	Geschlechtshormone .....	58
3.3.3	Modifizierter Hole-Board-Test.....	61
3.3.3.1	Kognitionsparameter .....	61
3.3.3.2	Verhaltensparameter.....	74
3.3.3.3	Motorische Parameter.....	89
3.3.4	Western-Blot .....	93
3.3.4.1	PBR-Expression .....	93
3.3.4.2	NMDAR-NR2B-Expression .....	94
3.3.4.3	mGluR5-Expression .....	95
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>97</b>

4.1	Diskussion der Methoden .....	97
4.1.1	Tg2576 als Tiermodell .....	97
4.1.2	Modifizierter Hole-Board-Test.....	100
4.1.3	Western-Blot-Verfahren .....	103
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	106
4.2.1	Mortalität .....	106
4.2.2	Physiologische Parameter.....	107
4.2.3	Kognition.....	110
4.2.4	Verhalten .....	114
4.2.5	Bewegungsverhalten .....	116
4.2.6	PBR-, NMDAR-NR2B- und mGluR5-Expression .....	118
4.2.7	Abschließende Betrachtung und Ausblick .....	120
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>154</b>
<b>11</b>	<b>Danksagungen.....</b>	<b>156</b>

# 1 Einleitung

In Zeiten einer alternden Gesellschaft nimmt der Anteil an Menschen, die einmal von der Alzheimer-Krankheit betroffen sein werden, stetig zu. Geschätzt werden im Jahr 2050 in Deutschland bereits über drei Millionen Menschen erkrankt sein (BICKEL, 2012). Der mit der Krankheit einhergehende progressive Verlust des kognitiven Leistungsvermögens und der Fähigkeit zu eigenständiger Lebensführung hat nicht nur für Betroffene und Angehörige, sondern auch für den gesamten Gesundheits- und Pflegesektor schwerwiegende Auswirkungen. Trotz jahrzehntelanger Forschung liegen die konkreten Pathomechanismen und Ursachen der Alzheimer-Krankheit weiter im Unklaren. Es wird eine multifaktorielle Ätiogenese angenommen, wobei epidemiologische und klinische Studien auch auf mögliche geschlechtsspezifische Diskrepanzen im Auftreten und Verlauf der Alzheimer-Krankheit schließen lassen. Einen hohen Stellenwert nimmt neben weiterer Grundlagenforschung die Suche nach verbesserten therapeutischen Konzepten für diese Krankheit ein, die heutzutage nach wie vor unweigerlich nach wenigen Jahren zum Tod führt. Als besonders wertvoll haben sich dafür transgene Mausmodelle erwiesen, die mutierte Gene als Auslöser der seltenen vererbaren Form der Alzheimer-Krankheit exprimieren und bestimmte Aspekte der Krankheit des Menschen in ähnlicher Weise abbilden. Die Forschung am Versuchstier ist besonders bei einer komplexen neurologischen Krankheit notwendig, um auch den Verlauf klinisch-pathologischer Veränderungen standardisiert untersuchen zu können. Die meisten Forschungsgruppen greifen primär auf den Morris-Water-Maze-Test als Goldstandard (TANILA, 2012) bei kognitiven Untersuchungen von Nagern oder auf ganze Testbatterien zurück, allerdings mit diskrepanten Ergebnissen. Dagegen soll in der vorliegenden Studie das transgene Mausmodell Tg2576 (HSIAO et al., 1996) erstmalig durch den Einsatz des modifizierten Hole-Board-Tests (OHL et al., 2003) eingehend charakterisiert werden. Dieser bietet den Vorteil der auf ein Minimum reduzierten Stressbelastung der Tiere und der gleichzeitigen, sensitiven Erfassung der Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses, des deklarativen Gedächtnisses und motorischer Parameter im Kontext des Verhaltens. Insbesondere soll geklärt werden, ob die Wahl des Geschlechts in verschiedenen Altersstufen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse nimmt. Ergänzt durch spezifische laboranalytische Auswertungen ist das Ziel dieser Studie, zu einer umfangreicheren Charakterisierung des Tg2576-Modells der Alzheimer-Krankheit beizutragen, um in Zukunft innovative Ansatzpunkte für effektivere therapeutische Interventionen entdecken und präklinisch überprüfen zu können.

## **2 Schrifttum**

### **2.1 Kognition und Verhalten**

Die Erforschung des menschlichen Geistes beschäftigt die Menschheit seit alters her. Bereits Platon glaubte, dass sich in die „Seelen“ der Menschen Wahrnehmungen als bleibende Erinnerungen wie in Wachstafeln eingravieren würden: „Was sich nun abdrückt, dessen erinnern wir uns und wissen es, solange nämlich sein Abbild vorhanden ist. Hat sich aber dieses verlöscht oder hat es gar nicht abgedruckt werden können, so vergessen wir die Sache und wissen sie nicht.“ (PLATON, 1940, S. 633) Damit lieferte schon dieser Philosoph der Antike erste Überlegungsansätze zur Funktionsweise mentaler Vorgänge und zur Unterscheidung verschiedener Gedächtnissysteme. Zur Zeit der sog. „kognitiven Revolution“ in der Mitte des 20. Jahrhunderts, als neben bloßen Beobachtungen des Verhaltens von Tieren auch mentale Prozesse stärker in den Mittelpunkt von Forschern rückten, ist der historisch verankerte Begriff der „Seele“ durch die Bezeichnung „Kognition“ ersetzt worden (GAUGGEL, 2008). Der Begriff Kognition stammt aus dem Lateinischen (lat. cognitio) (STOWASSER et al., 1998, S. 95) und kann mit „Erkennen“ übersetzt werden, was aber nur einen kleinen Teil der umfassenden Bedeutung widerzuspiegeln vermag, steht sie doch im heutigen Sinne für sämtliche mentalen Prozesse der Informationsverarbeitung wie Aufmerksamkeit, Wahrnehmung, Gedächtnis, Bewusstsein und dem Lösen von Problemen (GAUGGEL, 2008).

Somit stellen kognitive Prozesse die Grundlage des Verhaltens dar. Die Fähigkeit von Lebewesen, ihr Verhalten aufgrund von Erfahrungen zu modifizieren, wird nach EDELMANN und WITTMANN (2012) als Lernen verstanden. Um zu lernen, müssen zunächst Umweltstimuli aufgenommen, selektiv wahrgenommen und im Gehirn aktiv bearbeitet, also enkodiert werden (EDELMANN und WITTMANN, 2012). Wie effektiv sich der Lernvorgang gestaltet wird dabei unter anderem von Aufmerksamkeit, Motivation und Gelegenheit zur Wiederholung beeinflusst (D'MELLO und STECKLER, 1996). Je nach Relevanz kann die Information dann im entsprechenden Gedächtnissystem gespeichert werden.

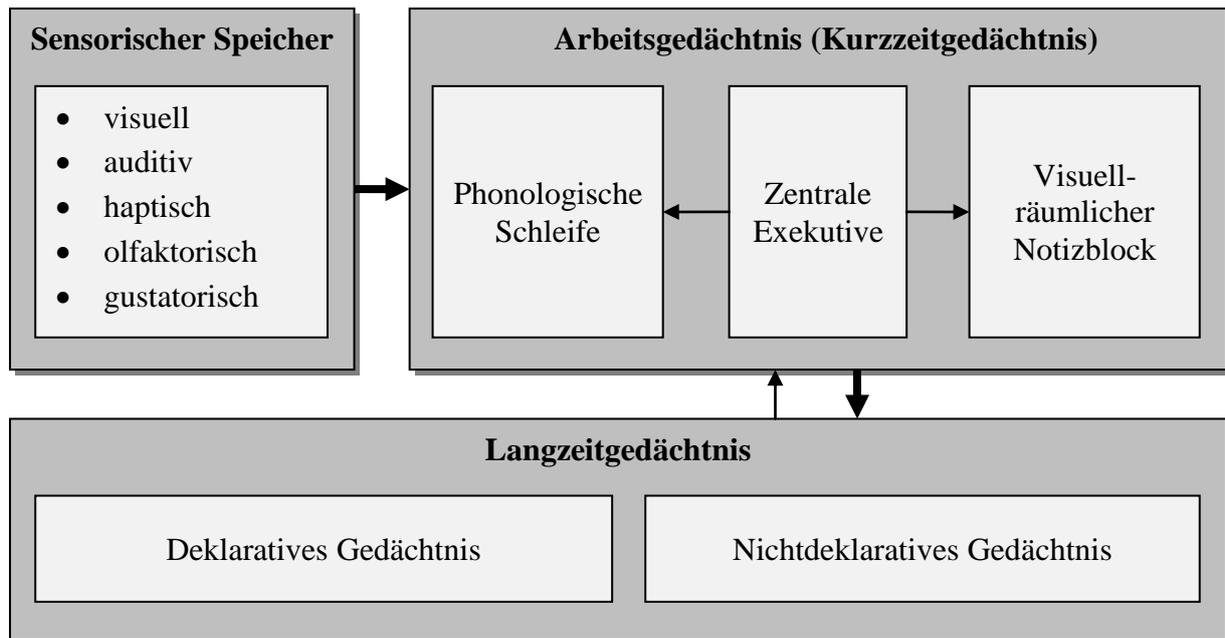
Das Verständnis für die Kognition und die weitere Verfeinerung kognitiver Theorien und Modelle sind laut HALLIGAN und DAVID (2001) entscheidend für die erfolgreiche Erforschung der Ursachen neurologischer Störungen wie dementieller Erkrankungen.

### **2.1.1 Klassifikation verschiedener Gedächtnissysteme**

Das Gedächtnis lässt sich sowohl nach zeitlichen wie auch nach inhaltlichen Aspekten klassifizieren. In Bezug auf die chronologische Dimension lassen sich nach dem Mehrspeichermodell von ATKINSON und SHIFFRIN (1968) ein sensorischer Speicher, Kurzzeitgedächtnis und Langzeitgedächtnis unterscheiden (siehe Abbildung 1). Demnach werden Sinneseindrücke für wenige hundert Millisekunden (SPERLING, 1960) im sensorischen Gedächtnis festgehalten und dort stark gefiltert. Nur ausgewählte relevante Informationen werden weiter in das Kurzzeitgedächtnis übertragen. Während die Informationen hier für wenige Minuten gespeichert werden, erfolgt ein fließender Kopiervorgang ausgesuchter Inhalte in das Langzeitgedächtnis (ATKINSON und SHIFFRIN, 1968). Im Gegensatz zum Kurzzeitgedächtnis weist das Langzeitgedächtnis eine sehr große Speicherkapazität auf und kann Inhalte dauerhaft behalten (EDELMAAN und WITTMANN, 2012).

Während ATKINSON und SHIFFRIN (1968) in ihrem Modell noch von drei separaten und zeitlich nacheinander geschalteten Gedächtnisspeichern ausgingen, spricht heutzutage vieles für eine interferierende und kontextabhängige Funktionsweise dieser Systeme (BURGESS und HITCH, 2005).

Abseits der Vorstellung eines funktionell einheitlichen Kurzzeitgedächtnisses differenzierten BADDELEY und HITCH (1974) das sog. „Arbeitsgedächtnis“ in verschiedene Komponenten (siehe Abbildung 1). Das Arbeitsgedächtnis steht für die gleichzeitige aktive, kurzfristige Speicherung und Bearbeitung von Informationen visuell-räumlicher und phonologischer Art. Ein später zusätzlich postulierter episodischer Zwischenspeicher vermag einzelne Informationen zu verknüpfen und steht dabei in Verbindung zum Langzeitgedächtnis (BADDELEY, 2000). Diese einzelnen Komponenten des Arbeitsgedächtnisses unterliegen der Kontrolle und Koordination durch die zentrale Exekutive, die das bewusste gleichzeitige Wahrnehmen verschiedener Reize einschränkt (BADDELEY, 2003).

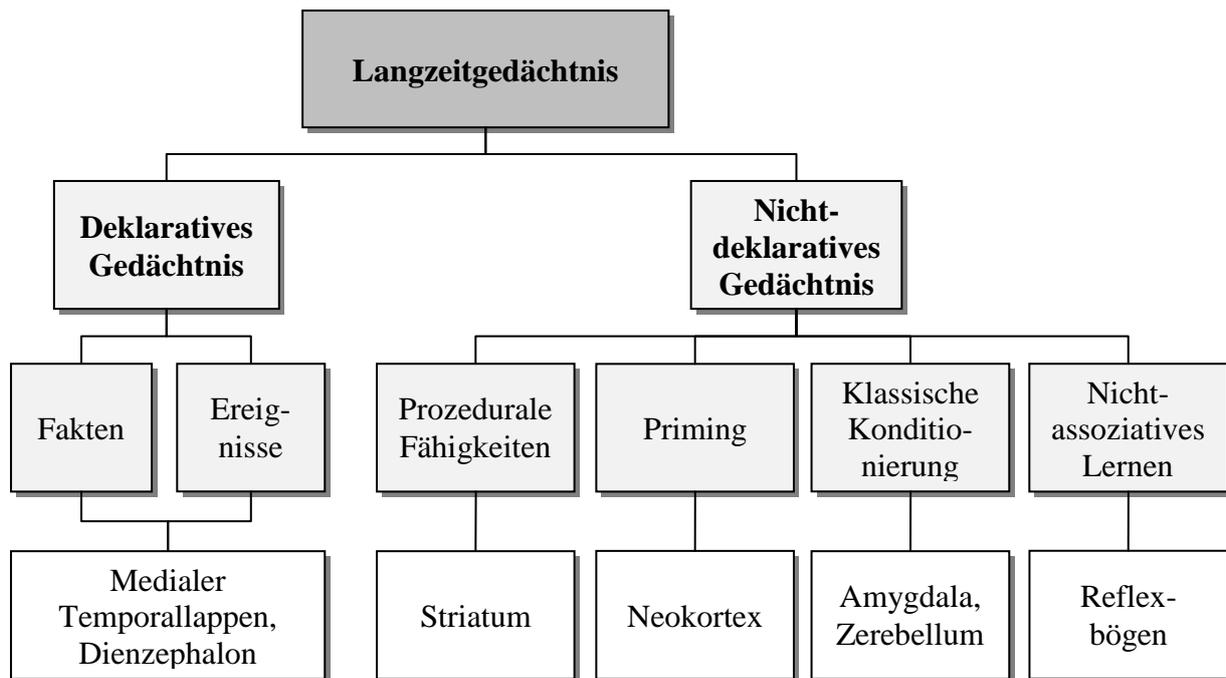


**Abbildung 1: Zeitliche Klassifikation des Gedächtnisses unter Vereinigung der Modelle nach ATKINSON und SHIFFRIN (1968) und BADDELEY und HITCH (1974) sowie inhaltliche Klassifikation des Langzeitgedächtnisses nach SQUIRE und ZOLA (1996) (modifiziert nach WINKEL et al. (2006, S. 36))**

Neben der zeitlichen Unterscheidung verschiedener Gedächtnissysteme kann auch eine Klassifikation nach deren Inhalt vorgenommen werden (siehe Abbildung 1 und 2).

TULVING (1972) revolutionierte die Gedächtnisforschung, indem er zwei verschiedene Langzeitgedächtnissysteme postulierte – das episodische und das semantische Gedächtnis. Dabei bezieht sich das episodische Gedächtnis auf Wissen über autobiographische Ereignisse in zeitlichem und räumlichem Kontext, während dem semantischen Gedächtnis rein kontextfreies Faktenwissen zugeordnet wird.

SQUIRE und ZOLA (1996) ordneten diese beiden Gedächtnisformen dem deklarativen Gedächtnis zu. Daneben definierten sie das nichtdeklarative Gedächtnis als ein Gedächtnissystem, dessen gespeicherten Informationen sich nicht bewusst erinnern lassen (siehe Abbildung 1). Dazu zählt das sog. „Priming“, das für eine verbesserte Verarbeitung jener Reize steht, die zuvor schon einmal wahrgenommen wurden (SQUIRE und KANDEL, 2009), sowie nichtassoziatives Lernen wie die Habituation oder die Sensitivierung im Bereich einfacher Lernvorgänge (BIRBAUMER und SCHMIDT, 2010). Des Weiteren werden dem nichtdeklarativen Gedächtnis die klassische Konditionierung und das prozedurale Lernen, also das Erlernen von Fertigkeiten und Gewohnheiten wie motorische Routinefähigkeiten, zugeordnet (SQUIRE und ZOLA, 1996) (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Modell des Langzeitgedächtnissystems mit involvierten Gehirnstrukturen (modifiziert nach SQUIRE und ZOLA (1996))**

### 2.1.2 Lern- und Gedächtnisprozesse

Bei der Gedächtnisverarbeitung lassen sich verschiedene Prozesse unterscheiden: die Einspeicherung (Enkodierung), Festigung (Konsolidierung), Ablagerung und der Abruf von Informationen (MARKOWITSCH, 2002). Über die Sinnessysteme gelangen Informationen in das Gehirn, wo sie je nach Gedächtnisinhalt entweder wie beim prozeduralen Gedächtnis und Priming direkt abgelegt werden (MARKOWITSCH, 2009) oder im Falle von semantischen und episodischen Inhalten vorübergehend in Strukturen des Parietal- und des Frontallappens des präfrontalen Kortex gelangen (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003) und schließlich im limbischen System auf Relevanz geprüft und sukzessive weiter gefestigt werden. Über einen wichtigen neuronalen Schaltkreis im limbischen System, dem Papez-Schaltkreis, erfolgt die Überführung von Informationen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis (MARKOWITSCH, 2002). Dabei werden die Inhalte als gefestigte Gedächtnisspuren vorrangig in den Netzwerken des zerebralen Kortex abgelagert und können bei Bedarf über verschiedene Hirnstrukturen wieder abgerufen werden (BADDELEY et al., 2000). MARKOWITSCH (2002) beschreibt Konsolidierungs- und Ablagerungsvorgänge als dynamische Prozesse, die vermutlich nicht in statischer, festgelegter Reihenfolge ablaufen.

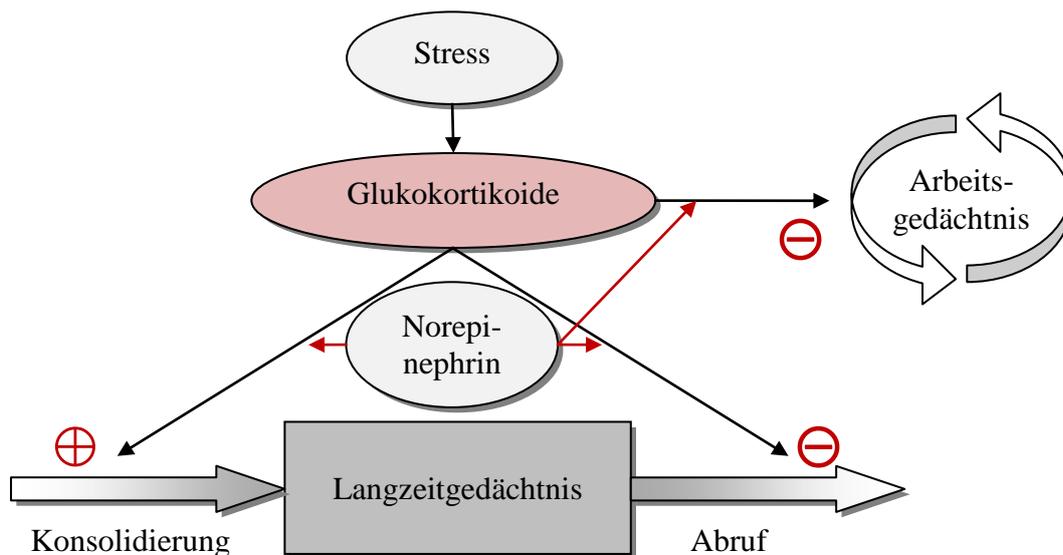
Dabei betonen BADDELEY et al. (2000) und MARKOWITSCH (2002), dass bei Lern- und Gedächtnisprozessen zwar je nach Gedächtnissystem verschiedene Bereiche des Gehirns eine bedeutende Rolle einnehmen (siehe Abbildung 2), diese Prozesse aber nicht vollständig auf den einzelnen neuronalen Strukturen beruhen, sondern vielmehr vom Zusammenspiel der neuronalen Netzwerke verschiedener Gehirnareale abhängen.

Eine wichtige Rolle bei den Konsolidierungsprozessen deklarativer Gedächtnisinhalte nimmt der Hippokampus als Teil des limbischen Systems im medialen Temporallappen des Gehirns ein (BUCHNER, 2006). Im Hippokampus erfolgt der Informationsaustausch mit den Assoziationsfeldern des Neokortex über reziproke Verbindungen mit dem entorhinalen und dem benachbarten perirhinalen und parahippokampalen Kortex (SQUIRE und ZOLA, 1996). Daher vermag das hippokampale System zwischen isolierten Gedächtnisinhalten Assoziationen herzustellen und diese in einen Gesamtkontext zu stellen (BIRBAUMER und SCHMIDT, 2010). Daraus resultiert die hohe Flexibilität des deklarativen Gedächtnisses – Beziehungen zwischen Einzelaspekten können gelernt werden und dabei helfen, neuartige Situationen zu erfassen (SQUIRE und KANDEL, 2009).

Besondere Bedeutung erlangt der Hippokampus bei der Verarbeitung räumlicher Informationen. So beschreibt O'KEEFE (1976) bei Ratten bestimmte Neuronen im Hippokampus, die sog. „Ortszellen“, deren elektrische Aktivität sich mit der Lage des Tieres im Raum verändern und in bekannter Umgebung besonders hohe Aktivität aufweisen. Es wird somit eine flexible Repräsentation des Raumes im Gedächtnis gespeichert, durch die das Tier weiß, wo es sich gerade befindet. Zahlreiche Versuche an Nagetieren mit geschädigtem Hippokampus unterstreichen seine Wichtigkeit. Dies lässt sich u. a. gut anhand einer Studie mit Ratten von EICHENBAUM et al. (1990) im sog. „Morris-Water-Maze-Test“ (MORRIS, 1984), einem Verhaltenstest für das räumliche Gedächtnis, aufzeigen. Dabei werden die Tiere in ein großes, rundes, mit trübem Wasser gefülltes Becken gesetzt. Über eine unterhalb der Wasseroberfläche befindliche und somit für die Ratten nicht sichtbare Plattform können die Tiere aus dem Wasser entkommen. In der Studie ließen die Forscher die Ratten von wechselnden Startpunkten aus schwimmen. Dabei erlerten nur gesunde Ratten, nicht aber solche mit einer Schädigung des Hippokampus, wie sie zielgerichtet die Lokalisation der rettenden Plattform anhand optischer Markierungen im Raum bestimmen können. Erst wenn die Hippokampus-geschädigten Tiere von immer derselben Position aus starten durften, konnten auch sie erfolgreich die Plattform finden. Diese Beobachtung lässt sich mit dem Zugriff auf das wesentlich unflexiblere nichtdeklarative Gedächtnissystem erklären:

Hippokampus-geschädigte Tiere schwimmen bei jedem Versuchsdurchgang dieselbe Bahn und können nicht erfolgreich auf Veränderungen reagieren.

Anhand verschiedener Studien an Mensch und Tier wird die Abhängigkeit mentaler Prozesse von emotionalen Bedeutungen deutlich (DE QUERVAIN et al., 2009). Bei der Verarbeitung emotionaler Gedächtnisinhalte spielen die Amygdala und deren Faserverbindungen zum mediodorsalen Thalamus und dem basalen Vorderhirn sowie die Interaktion mit weiteren Gehirnregionen, wie dem Hippokampus und neokortikalen Regionen, eine wichtige Rolle (MARKOWITSCH, 2002; DE QUERVAIN et al., 2009). Die noradrenerge Aktivierung der Amygdala durch Glukokortikoide und Norepinephrin als freigesetzte Stresshormone führt zu einer Verstärkung der Gedächtniskonsolidierung, wodurch sich an emotional erregende Ereignisse besser erinnern lässt als an neutrale (ROOZENDAAL, 2000). Dagegen wirken sich Glukokortikoide in einer stressigen Situation negativ auf das Arbeitsgedächtnis und den Abruf von Informationen aus (DE QUERVAIN et al., 2009) (siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Beeinflussung der Gedächtnisfunktionen durch Stresshormone (modifiziert nach DE QUERVAIN et al. (2009))**

Negative Auswirkungen von Stress auf räumliches Denken konnten gut in einer Studie von DE QUERVAIN et al. (1998) aufgezeigt werden, in der Ratten im Morris-Water-Maze schlechtere Ergebnisse erzielten, wenn sie 30 min vor dem Test einer hohen Stressbelastung ausgesetzt worden waren. In diesem zeitlichen Abstand konnte die höchste Menge an zirkulierendem Kortikosteron im Blut gemessen werden. Neben akutem kann auch chronischer Stress über Beeinflussung der Plastizität neuronaler Netzwerke zu kognitiven Beeinträchtigungen führen - und scheint sogar mit einem erhöhten Risiko für dementielle

Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit oder einem rascheren Fortschreiten derselben in Zusammenhang gebracht werden zu können (ROTHMAN und MATTSON, 2010).

Auf molekularer Ebene sind die vielfältigen Lern- und Gedächtnisprozesse abhängig von Proteinmodifikationen, Proteinneosynthese und der Plastizität neuronaler Strukturen (KANDEL, 2001). Erst die Plastizität ermöglicht die unterschiedlichen adaptiven Prozesse des Gehirns. So basiert gemäß der Hebb'schen Regel die synaptische Plastizität auf der aktivitätsabhängigen Änderung der synaptischen Übertragungsstärke zwischen Neuronen (HEBB, 1949). Bei dieser Modulierbarkeit der synaptischen Übertragung kann zwischen Verstärkung (Potenzierung) und Verminderung (Depression) unterschieden werden. Dabei wird die Langzeitpotenzierung (LTP), erstmals beschrieben von BLISS und LOMO (1973), als mögliches zelluläres Korrelat für Lernen und Gedächtnis angesehen (LYNCH, 2004). Die LTP entsteht durch die hochfrequente Stimulation der präsynaptischen Membran, wodurch der erregende Neurotransmitter Glutamat vermehrt freigesetzt wird und postsynaptische Rezeptoren aktiviert (REVETT et al., 2012).

### **2.1.3 Verhaltenstests für Tiermodelle**

Tiermodelle spielen eine zentrale Rolle in der Erforschung (patho-)physiologischer Lern- und Gedächtnisvorgänge. Die Forschung an Lebewesen im Vergleich zu In-vitro-Untersuchungsmethoden bietet den Vorteil neben isolierten Aspekten auch das Zusammenspiel unterschiedlicher grundlegender Mechanismen betrachten zu können (VAN DER STAAY et al., 2009). Dies schließt verschiedenste Untersuchungen, wie genetische, biochemische, elektrophysiologische und morphologische Methoden, ein (MARKOWITSCH, 2002). Angesichts häufiger Schwierigkeiten, Ergebnisse pharmakologischer Tierstudien auf den Menschen zu übertragen, scheint es besonders wichtig, sich nicht nur auf die offensichtlichsten Aspekte einzelner experimenteller Ergebnisse zu fokussieren, sondern das Tiermodell in seiner Gesamtheit zu erfassen. Nach WESSON et al. (2011) sollten dabei schon in vivo auf unterschiedliche Art möglichst viele Daten gesammelt werden, um die Ursachen veränderten Verhaltens und Kognition im Zusammenhang ergründen zu können.

Zur Erforschung kognitiver Dysfunktionen des Menschen werden am häufigsten Nagetiere genutzt (D'MELLO und STECKLER, 1996). Dabei steht immer wieder die Frage nach der Vergleichbarkeit der Gedächtnisprozesse zwischen Nager und Mensch im Raum. Trotz zahlreicher Unterschiede zwischen diesen beiden Spezies, sei es bei psychologischen

Vorgängen, der kognitiven Leistungsfähigkeit, der Anatomie des Gehirns oder der Kommunikation, können unter Berücksichtigung der spezifischen Fähigkeiten von Nagern valide Testmodelle geschaffen werden. Dafür müssen allerdings gezielt Testparadigmen gewählt werden, die einen Vergleich mit den entsprechenden kognitiven Tests bei Menschen erlauben (STECKLER und MUIR, 1996). Die Validierung beruht auf vier Kriterien: Abbildungsvalidität (Ähnlichkeit des kognitiven Prozesses zwischen Tier und Mensch), konkurrierende Validität (Vergleich des kognitiven Prozesses in verschiedenen Modellen), prädiktive Validität (Übereinstimmende Pharmaka- oder Schadensauswirkungen bei Tier und Mensch) und Konstruktvalidität (Genauigkeit der Wiedergabe theoretischer Überlegungen) (D'MELLO und STECKLER, 1996).

Einen wichtigen Vorteil gegenüber klinischen Studien beim Menschen stellt bei experimentellen Studien am Tier die Standardisierbarkeit und damit die bessere Vergleichbarkeit dar (VAN DER STAAY, 2006). Dabei erweisen sich Verhaltenstests als essentiell für die Charakterisierung von Tiermodellen für kognitive Störungen des Menschen, um zugrundeliegende neurobiologische Mechanismen und die Auswirkungen pharmakologischer Behandlungen erforschen zu können (OHL et al., 2001).

Zur Untersuchung der Kognition werden häufig verschiedene Formen von Labyrinthen eingesetzt (HODGES, H., 1996). Um sich darin zielgerichtet bewegen zu können, bedienen sich die Tiere visueller Markierungen im Raum und erstellen daraus eine mentale Repräsentation der Umwelt, eine Art kognitive Landkarte (O'KEEFE, 1976; HODGES, H., 1996).

Ein in der Forschung sehr häufig eingesetzter Verhaltenstest ist dabei der Morris-Water-Maze-Test (MWM) (MORRIS, 1984), der primär dazu genutzt wird, Rückschlüsse auf das räumliche Langzeitgedächtnis zu ziehen. Wie zuvor beschrieben, handelt es sich dabei um ein rundes Becken, das mit trübem Wasser gefüllt ist. Durch die Aversion gegen Wasser motiviert sollen die Tiere von wechselnden Startpunkten aus eine unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform finden. Die Orientierung kann dabei durch im Raum angebrachte Markierungen erfolgen. Die Lernfähigkeit des Tieres wird anhand der Zeitspanne gemessen, die das Tier bis zum erneuten Auffinden der Plattform benötigt.

Einfach aufgebaute Labyrinth stellen die T- oder Y-förmigen Verhaltenstests in ihren zahlreichen Varianten dar. Statt Flucht aus einer potentiell lebensbedrohlichen Situation wie im MWM, liegt hier die Motivation in der Befriedigung des Fresstriebs (HODGES, H., 1996). Ein Beispiel stellt das sog. „T-Labyrinth mit erzwungener Alternation“ dar. Dabei absolviert

das Tier mehrere Durchläufe an aufeinanderfolgenden Tagen, wobei jeder Durchlauf aus zwei Teilen besteht. Im ersten Teil versperrt ein Objekt den Eingang eines Armes, so dass das Tier gezwungen ist, die andere Seite zu wählen, in der sich eine Futterbelohnung befindet. Im zweiten Teil sind beide Arme geöffnet, die Belohnung ist nun aber nur noch im zuvor nicht besuchten Arm des Labyrinths zu finden. Die korrekte Bewältigung des Tests durch Alternation der Armbesuche beruht hauptsächlich auf dem räumlichen Arbeitsgedächtnis (STEWART et al., 2011).

Andere Verhaltenstests basieren primär auf dem angeborenen Angstverhalten der Tiere (OHL, 2003). Der sog. „Open-Field-Test“ wurde von HALL und BALLACHEY (1932) zur Untersuchung der Emotionalität von Ratten eingeführt. In dieser Studie wird gezeigt, dass der Kotabsatz der Ratten mit ihrer Ängstlichkeit korreliert. Ursprünglich ist das „Open-Field“ eine nach oben offene, hell erleuchtete, runde Arena, wobei mittlerweile eine Vielzahl von Varianten genutzt wird. Die Tiere werden mit dieser neuen und unbekanntem Umgebung konfrontiert, indem sie in der Testarena entweder zentral oder peripher abgesetzt werden. Dies führt bei Nagetieren zu einem Konflikt zwischen Erkundungsdrang einerseits und der Angst vor der fremden Situation und möglichen Gefahren andererseits. Daher vermeiden die Tiere zunächst den ungeschützten zentralen Bereich und suchen in der Nähe der Wand, der sog. „Thigmotaxiszone“, Schutz (OHL, 2003).

Während sich die meisten Verhaltenstests nur zur Untersuchung weniger definierter Parameter eignen, stellt der sog. „modifizierte Hole-Board-Test“ (mHBT) ein etabliertes, komplexes, räumliches Testparadigma dar, das die gleichzeitige Untersuchung einer Vielzahl von Parametern ermöglicht (GORDAN et al., 2012). Nach OHL et al. (2001) vereint der mHBT die Eigenschaften des Open-Field-Tests mit dem Hole-Board-Test. Der Hole-Board-Test wurde ursprünglich entwickelt, um das Erkundungsverhalten von Nagetieren zu untersuchen (FILE und WARDILL, 1975). Später erfuhr der Test zahlreiche Modifikationen zur Untersuchung von Kognition und Verhalten von Spitzhörnchen (OHL et al., 1998) und Ratten (OHL et al., 2001) bis hin zu Mäusen. Der Versuchsaufbau des mHBTs für Mäuse (OHL et al., 2003) besteht aus einer quadratischen nach oben offenen Box, in der zentral ein Brett mit zehn nach oben offenen Zylindern liegt. Im Rahmen der kognitiven Untersuchung sollen die Versuchstiere lernen, dass nur in den drei markierten Zylindern eine erreichbare Futterbelohnung zu finden ist. Neben der Beurteilung der Leistungsfähigkeit des deklarativen Gedächtnisses und des Arbeitsgedächtnisses können die allgemeine Fortbewegungsaktivität, die Feinmotorik und ein breites Spektrum an Verhaltensdimensionen untersucht werden (OHL et al., 2003). Somit lassen sich mit dem mHBT einige Forderungen von D'MELLO und

STECKLER (1996) über die Schaffung eines idealen Modells erfüllen: Es handelt sich um einen standardisierten, replizierbaren Verhaltenstest, der auf positiver Motivation, nämlich Futterbelohnung, beruht und verschiedene Aspekte der Leistungsfähigkeit der Versuchstiere erfasst. Die räumliche Natur des Tests wird durch den Einsatz einer Aromalösung und der zusätzlichen unerreichbaren Bestückung aller Löcher mit Mandeln gewährleistet, so dass ungewollte olfaktorische Hinweise verhindert werden. Zudem konnte der Test bereits bei verschiedenen Spezies erfolgreich eingesetzt und etabliert werden (OHL et al., 2003; VAN DER STAAY et al., 2012; GORDAN et al., 2012).

## **2.2 Die Alzheimer-Krankheit**

Vor über 100 Jahren beschrieb der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer erstmals die Symptome einer besonderen Form der Demenz (ALZHEIMER, 1907), die im Jahr 1910 nach ihm benannt werden sollte (KRAEPELIN, 1910). Seine Patientin Auguste Deter litt unter progressivem Gedächtnisverlust, räumlicher sowie zeitlicher Desorientierung, Kommunikationsproblemen und auffälligen Verhaltensänderungen. Herausragend für diese Zeit war, dass Alzheimer der klinischen Symptomatik eine neuropathologische Ursache zugrunde legte (ALZHEIMER, 1907; LAGE, 2006). Nach dem Tod von Auguste Deter nach 4,5 Jahren Krankheitsdauer fand er ein atrophisches Gehirn mit „miliaren Herdchen“ in der Hirnrinde sowie „aufgeknäuelten Bündeln von Fibrillen“ vor (ALZHEIMER, 1907). Diese sog. „Amyloid-Plaques“ und „Neurofibrillenbündel“ gelten heute als pathognomonisch für die Alzheimer-Krankheit (AK).

Erst Jahrzehnte nach der Erstbeschreibung wurde man sich der Tragweite dieser Erkrankung bewusst. Die AK macht mit 50 bis 70 % aller Fälle die häufigste der dementiellen Krankheitsformen aus. Dabei sind Demenzen durch den fortschreitenden Verlust kognitiver Fähigkeiten gekennzeichnet, der zu einer ausgeprägten Beeinträchtigung des Alltagslebens führt, und müssen daher klar von physiologischen Alterungsprozessen abgegrenzt werden (QIU et al., 2007). Da es bis heute keine kausale Therapie der AK gibt, führt diese unweigerlich zum Tod meist durch Sekundärerkrankungen aufgrund einer Schwächung des Organismus. Erschwerend kommt hinzu, dass die vorläufige klinische Verdachtsdiagnose erst post mortem durch neuropathologische Untersuchungen zweifelsfrei bestätigt werden kann (BALLARD et al., 2011).

Die AK stellt die Menschheit vor große medizinische, soziale und sozioökonomische Herausforderungen. Im Zuge dieser nimmt die Forschung einen herausragenden Stellenwert ein, um die der Krankheit zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken und so für verbesserte Möglichkeiten für die Früherkennung einerseits und die Therapie andererseits zu sorgen (BALLARD et al., 2011).

### **2.2.1 Epidemiologie**

In Deutschland und anderen europäischen Industrienationen steigt die Zahl der an Demenz erkrankten Menschen laut der EuroCoDe-Studie (European Collaboration on Dementia) mit fast 2 % bei den 65 bis 69-Jährigen auf rund 40 % bei den über 90-Jährigen an (ALZHEIMER EUROPE, 2009). Allein in Deutschland leben derzeit über 1,4 Millionen Demenzkranke und jährlich kommen etwa 300000 Neuerkrankte hinzu. Die Überlebenszeit der Alzheimer-Patienten ist durch die Schwierigkeiten bei der Diagnose nicht genau zu beziffern; es wird durchschnittlich von einem Zeitraum von 3 bis 6 Jahren ausgegangen, der in Einzelfällen aber auch deutlich überschritten werden kann. Im Allgemeinen ist die Krankheitsdauer umso kürzer, je später die Erkrankung lebensgeschichtlich in Erscheinung tritt (BICKEL, 2012).

Das globale Ausmaß der AK lässt sich durch vergleichbare Zahlen in Amerika verdeutlichen. So leidet allein jeder achte Amerikaner über 65 Jahren an dieser Krankheit. Dies entsprach im Jahr 2012 etwa 5,4 Millionen Menschen. In der Altersgruppe der über 85-Jährigen ist sogar fast die Hälfte betroffen. Die Prävalenz- und Inzidenzraten steigen exponentiell mit dem Alter. Dabei bezeichnet die Prävalenz die Anzahl an Kranken in der Bevölkerung zu einem bestimmten Zeitpunkt und die Inzidenz die Zahl neuer Fälle in einem bestimmten Zeitraum, also das Erkrankungsrisiko (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2012). Die Situation ist besonders problematisch angesichts des demographischen Wandels: Durch steigende Lebenserwartung und rückläufige Geburtsraten kommt es zu einer überproportionalen Zunahme sehr alter Menschen (BICKEL, 2005). Erkrankte 2012 noch alle 68 Sekunden ein Amerikaner an der AK, wird es Schätzungen zufolge im Jahr 2050 bereits alle 33 Sekunden sein (HEBERT et al., 2001; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2012). Dabei werden die geschätzten Kosten für Gesundheitsfürsorge, Langzeitpflege und Hospiz-Aufenthalte von 200 Milliarden auf 1,1 Billionen Dollar in der Mitte des Jahrtausends steigen (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2012).

Die AK ist durch die hohe Zahl Erkrankter die wichtigste Ursache für Pflegebedürftigkeit im Alter (BICKEL, 2005). Sie stellt ein dramatisches Gesundheitsproblem der heutigen Zeit dar und wird es vermutlich auch für die nächsten Dekaden bleiben (SLOANE et al., 2002).

### **2.2.2 Pathophysiologie**

Die charakteristischen pathologischen Merkmale im Gehirn von Alzheimer-Patienten sind intrazelluläre Neurofibrillenbündel („neurofibrillary tangles“, NFTs) mit hyperphosphoryliertem Tau-Protein sowie extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen (Plaques), die hauptsächlich aus Amyloid-beta (A $\beta$ )-Peptiden bestehen (GLENNER und WONG, 1984; FINDER, 2010). Nach THAL et al. (2002) treten die Plaques bevorzugt im Isokortex in Erscheinung, gefolgt von entorhinalem Kortex, Hippokampus und Amygdala. Im weiteren Verlauf sind Striatum, Diencephalon, Hirnstamm und schließlich das Kleinhirn betroffen. Während die Ablagerung der Amyloid-Plaques individuellen Unterschieden unterworfen ist, scheint die Bildung der NFTs nach einem einheitlicheren Muster zu verlaufen. NFTs finden sich zunächst im transentorhinalen Kortex, breiten sich über das limbische System mit Hippokampus und Amygdala bis hin zum Isokortex im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung aus (BRAAK und BRAAK, 1991).

Die sog. „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ hat seit ihrer ersten Beschreibung vor mehr als zwei Jahrzehnten die Forschung dominiert. Demnach stellt die Ablagerung von A $\beta$  das zentrale und entscheidende Ereignis der Pathophysiologie der AK dar, dessen direkte Folge kaskadenartig ablaufende Prozesse sind, die schließlich zum klinischen Bild der Demenz führen (HARDY, J. A. und HIGGINS, 1992; HARDY, J. und SELKOE, 2002). Doch angesichts zahlreicher Fehlschläge mit auf A $\beta$  ausgerichteten Therapiekonzepten muss die Amyloid-Hypothese und insbesondere die Bedeutung der Plaques neu überdacht werden (PIMPLIKAR, 2009). Es zeigte sich, dass die Anzahl von Plaques nicht gut mit dem Ausprägungsgrad der Demenz korreliert und Plaques durchaus auch bei älteren Menschen ohne Gedächtnisbeeinträchtigungen gefunden werden können (NELSON et al., 2012).

Heute wird vielfach eine multikausale Ätiopathogenese der AK angenommen. Was also sind die heutzutage vermuteten pathophysiologischen Zusammenhänge und welche Rolle spielen A $\beta$ -Peptide?

### 2.2.2.1 Amyloid-Peptid

Wie in einer Übersicht von SELKOE (2001) dargestellt, entstehen die A $\beta$ -Peptide aus dem Amyloid-Vorläuferprotein („Amyloid-Precursor-Protein“, APP) – einem Transmembranprotein mit einem kurzen zytoplasmatischen Anteil, dem COOH-Ende, einer Transmembrandomäne und einem langen extrazellulären NH<sub>2</sub>-Ende. Das Protein wird durch ein Gen auf Chromosom 21 kodiert (KANG et al., 1987) und ubiquitär in verschiedenen Isoformen exprimiert, wobei die vorherrschenden Formen 695, 751 und 770 Aminosäuren lang sind (SELKOE, 2001). APP kann an verschiedenen Stellen proteolytisch gespalten werden. Überwiegend wird es durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert, was die Bildung von A $\beta$  ausschließt (ESCH et al., 1990) und somit als nicht-amyloidogener Weg bezeichnet wird (FINDER, 2010). Die Freisetzung der A $\beta$ -Peptide erfolgt durch sukzessive proteolytische Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase („beta-site APP cleaving enzyme“, BACE) (VASSAR et al., 1999) und anschließend der  $\gamma$ -Sekretase. Dabei erfolgt die Spaltung zunächst in der N-terminalen extrazellulären Region und dann innerhalb der Transmembrandomäne (SELKOE, 2001). Die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase wird als der limitierende Schritt für die Rate dieses amyloidogenen Weges angesehen (MURPHY und LEVINE III, 2010).

Bei der  $\gamma$ -Sekretase handelt es sich um einen membranständigen Enzymkomplex, der u. a. auch in der Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle spielt und sich aus vier Proteinen zusammensetzt: Präsenilin als katalytisches Zentrum, Präsenilin-Verstärker 2 („Presenilin Enhancer 2“, Pen-2), Nicastrin und „Anterior Pharynx-defective 1“ (Aph-1) (SATO et al., 2007). Die Bedeutung von Präsenilin (PS) in seinen zwei Isoformen PS1 und PS2 konnte im Mausmodell unterstrichen werden. So führte eine Ausschaltung des PS1-Gens zu reduzierter A $\beta$ -Produktion (HERREMAN et al., 2000), während der zusätzliche Knockout von PS2 die A $\beta$ -Bildung in embryonalen Stammzellen gänzlich verhinderte (HERREMAN et al., 2000). Dabei war das Ausschalten der jeweiligen Gene nicht mit dem Leben der Mäuse vereinbar (DE STROOPER et al., 1998; HERREMAN et al., 2000). Die  $\gamma$ -Sekretase schneidet APP als Substrat an verschiedenen Stellen, was zu C-terminaler Heterogenität und damit zur Bildung unterschiedlich langer A $\beta$ -Peptide führt. So beeinflussen beispielsweise Mutationen im Präsenilin bei familiären Formen der AK die katalytische Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase und können die Entstehung längerer A $\beta$ -Formen begünstigen (SELKOE und WOLFE, 2007). Die Länge dieser amphiphilen Spaltprodukte ist entscheidend für ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, da mit zunehmender Anzahl an Aminosäuren die Tendenz zu Oligomerisierung und Bildung unlöslicher Fibrillen steigt (BITAN et al., 2003). Studien an

Menschen und mit Mausmodellen zeigen, dass das A $\beta$ 42-Isomer ausschlaggebend für die Entstehung von Amyloid-Plaques ist (IWATSUBO et al., 1994; MCGOWAN et al., 2005). Physiologisch herrschen die A $\beta$ -Formen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 in einem Verhältnis von 10:1 vor. (FINDER, 2010). Unabhängig von den absoluten Mengen haben schon geringe Änderungen des relativen Verhältnisses starke Auswirkungen auf die Tendenz zur Aggregation und Induktion synaptischer Toxizität (KUPERSTEIN et al., 2010).

Zahlreiche Studien weisen auf die toxischen Wirkungen hoher A $\beta$ -Konzentrationen auf Zellkulturen oder Maushirne nach A $\beta$ -Injektion hin. Doch stellt sich die Frage, ob dieses Vorgehen die In-vivo-Verhältnisse bei der AK widerzuspiegeln vermag (PIMPLIKAR, 2009). Die A $\beta$ -Entstehung an sich ist kein rein pathologisches Geschehen – auch in Zerebrospinalflüssigkeit und Blutplasma kognitiv unauffälliger Personen sowie im Medium kultivierter Zellen lassen sich A $\beta$ -Peptide nachweisen (HAASS et al., 1992; SEUBERT et al., 1992). Die physiologischen Funktionen dieser A $\beta$ -Peptide sind nicht abschließend geklärt, doch scheint A $\beta$  unter anderem neuroprotektiv (PLANT et al., 2003) und antimikrobiell (SOSCIA et al., 2010) zu wirken und eine Rolle bei Lernvorgängen zu spielen (MORLEY et al., 2010). So erweisen sich endogenen A $\beta$ 42-Peptide als notwendig für die synaptische Plastizität im Hippokampus (PUZZO et al., 2011).

Abseits von A $\beta$ -Monomeren und Plaques spricht immer mehr für lösliche A $\beta$ -Oligomere als eine der vorwiegenden toxischen Agenzien bei der AK. A $\beta$ -Oligomere konnten unter anderem in einer Studie von SHANKAR et al. (2008) aus dem zerebralen Kortex von Alzheimer-Patienten isoliert werden. Im Gegensatz zu A $\beta$ -Plaques führten die Oligomere zur Inhibition der Langzeitpotenzierung (LTP), Verstärkung der Langzeitdepression (LTD) und Verringerung dendritischer Dornfortsätze im murinen Hippokampus, was wiederum zu Plastizitätsstörungen führte. Des Weiteren zeigte sich, dass die Menge löslicher A $\beta$ -Oligomere im Gehirn von Alzheimer-Patienten mit deren kognitiven Dysfunktion korreliert (TOMIC et al., 2009). Auch in Tiermodellen lösen A $\beta$ -Oligomere kognitive Störungen aus. So scheinen Lerndefizite im transgenen Mausmodell Tg2576 abhängig vom Auftreten von löslichen A $\beta$ -Oligomeren und weniger von unlöslichen A $\beta$ -Plaques zu sein (LESNE et al., 2006; LESNE et al., 2008). Ebenso löst die Injektion bestimmter A $\beta$ -Oligomere in die Gehirnvventrikel von Ratten kognitive Defizite aus (SHANKAR et al., 2008; REED et al., 2011).

A $\beta$ -Oligomere stellen eine sehr heterogene Gruppe von Peptiden dar. Ob Dimere, Trimere oder größere Moleküleinheiten die höchste Toxizität aufweisen, kann angesichts konträrer

Ergebnisse verschiedener Studien nur spekuliert werden. Genauso offen ist der genaue Vorgang der Oligomerisierung bis hin zur Bildung der fibrillären und unlöslichen Aggregate. Dabei gibt es Hinweise, dass A $\beta$ -Plaques als Reservoir für A $\beta$ -Oligomere dienen könnten (KOFFIE et al., 2009)

#### **2.2.2.2 Tau-Protein**

Neben A $\beta$ -Plaques stellen Neurofibrillenbündel (NFTs) in Soma und Dendriten der Neurone ein typisches pathologisches Merkmal der AK dar (MANDELKOW und MANDELKOW, 2012). Die Entstehung der NFTs ist vermutlich eine Folge von Hyperphosphorylierung und Glykosylierung von Tau-Proteinen (WEINGARTEN et al., 1975; GRUNDKE-IQBAL et al., 1986), die dadurch ihre physiologische Bindung an die Mikrotubuli verlieren und u. a. zu paarigen helikalen Filamenten aggregieren (MANDELKOW und MANDELKOW, 2012). Dieser pathologische Vorgang der Hyperphosphorylierung resultiert aus einer Störung des Gleichgewichts zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung, an der verschiedene Phosphatasen und Kinasen beteiligt sind (IQBAL und GRUNDKE-IQBAL, 2008). Eine physiologische Hauptfunktion des Tau-Proteins ist die Stabilisation axonaler Mikrotubuli für Zelltransportmechanismen (DIXIT et al., 2008). Des Weiteren scheint Tau im Zusammenspiel mit der Tyrosinkinase Fyn, die u. a. mit dem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor interagiert, dendritische Funktionen aufzuweisen (ITTNER et al., 2010). Interessanterweise führen Mutationen im Tau-Protein zwar nicht zur AK, aber zu Krankheiten, die sich ebenfalls durch kognitive Defizite auszeichnen, den sog. „Tauopathien“ (SPILLANTINI et al., 1998; IQBAL und GRUNDKE-IQBAL, 2008).

Das Ausmaß von NFT-Ablagerungen im Isokortex korreliert relativ gut mit dem klinischen Bild kognitiver Beeinträchtigungen von Alzheimer-Patienten (NELSON et al., 2012). Allerdings lassen neue Studien wie die von SYDOW et al. (2011) vermuten, dass nicht die aggregierte, sondern eine lösliche Form des Tau-Proteins für toxische Effekte wie die LTP-Reduktion verantwortlich ist, da sich nach dem Abschalten der Expression eines mutierten Tau-Transgens die Lerndefizite trotz vorliegender NFTs als reversibel erwiesen.

Vieles spricht bei der AK dafür, dass analog zur Amyloid-Kaskaden-Hypothese A $\beta$ -Peptide die grundlegende Ursache für die Bildung von NFTs sind. So zeigen GAMBLIN et al. (2003) auf, dass A $\beta$ 42 in vitro die Spaltung von Tau-Protein durch Kaspasen und eine damit verbundene NFT-Bildung auslöst. Übereinstimmend damit weist ein doppeltransgenes Mausmodell (Tg2576 x JNPL3), das APP- und Tau-Mutationen des Menschen

überexprimiert, mehr NFTs im Vergleich zum einfach transgenen JNPL3-Modell auf (LEWIS et al., 2001). Im Gegensatz dazu scheinen Tau-Proteine aber auch selbst mit eine Voraussetzung für die A $\beta$ -medierte Toxizität zu sein, da in transgenen APP-Mausmodellen durch Tau-Mangel kognitive Defizite verhindert werden können. Dabei scheint die Interaktion mit der Kinase Fyn eine wichtige Rolle zu spielen (ITTNER et al., 2010; ROBERSON et al., 2011).

### **2.2.2.3 Entzündungsreaktion**

Die AK geht mit einer chronischen lokalen Entzündungsreaktion im Gehirn einher. Dabei stellt sich die Frage, ob diese lediglich eine sekundäre Antwort als Schutzmechanismus gegenüber A $\beta$ -Plaques-Ablagerung und Neurodegeneration darstellt, oder ob sie vielmehr als Auslöser und/oder Verstärker der AK wirkt. Als Zeichen der Entzündungsreaktion gelten reaktive Astrozyten und aktivierte Mikrogliazellen, die Immunzellen des Gehirns, die die A $\beta$ -Plaques umgeben (GLASS et al., 2010). Die Aktivierung von Mikrogliazellen kann beispielsweise schon durch Erkennung von fibrillärem A $\beta$  durch bestimmte Oberflächenrezeptoren, den Toll-ähnlichen Rezeptoren („Toll-like receptors“, TLR) und der Unterscheidungsgruppe 14 („Cluster of differentiation 14“, CD14) als Ko-Rezeptor erfolgen (REED-GEAGHAN et al., 2009). Durch Interaktion von A $\beta$  mit weiteren Oberflächenrezeptoren werden Signalkaskaden aktiviert, die u. a. die Phagozytose-Aktivität steigern und für vermehrte Bildung von Zytokinen, Chemokinen, reaktiven Sauerstoffspezies, Stickstoffmonoxid und Prostaglandinen sorgen können (WILKINSON et al., 2006; GLASS et al., 2010). So führt die Expression einer nicht-funktionellen Mutation des Oberflächenrezeptors TLR4 in einem transgenen Mausmodell der AK zu vermehrter A $\beta$ -Plaques-Ablagerung und verringerter Sezernation verschiedener Zytokine (JIN et al., 2008). Zeichen vermehrter regionaler Aktivierung von Mikroglia ist die Hochregulation peripherer Benzodiazepin-Rezeptoren (PBR), die als Biomarker für die Neuroinflammation genutzt werden kann (GULYAS et al., 2009). Die erhöhte PBR-Expression in Mikrogliazellen steht in Zusammenhang mit zugrunde gegangenen Neuronen, während die Expression in Astrozyten eher mit neuroprotektiven Wirkungen einherzugehen scheint (JI et al., 2008).

Entzündungsprozesse werden als zweiseitiges Schwert gesehen. Auf der einen Seite steht die neuroprotektive Wirkung der Gliazellen, die neurotrophe Substanzen bilden und beschädigtes Gewebe einschließlich Plaques phagozytieren können (SIMARD et al., 2006). Auf der anderen Seite kann es zu einer übermäßigen Freisetzung zytotoxischer Substanzen

kommen, die den Krankheitsprozess verstärken. Insbesondere A $\beta$ 42-Oligomere scheinen starke Entzündungsreaktionen und oxidativen Stress zu induzieren, indem u. a. vermehrt Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Superoxidanionen (SOA) freigesetzt werden. Dabei verhindern proinflammatorische Zytokine gleichzeitig eine effektive Phagozytose-Aktivität (KOENIGSKNECHT-TALBOO und LANDRETH, 2005; PAN et al., 2011). Plaques können nicht vollständig beseitigt werden und bewirken die Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozesse. Die Freisetzung von Faktoren wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  durch Mikroglia aktiviert Astrozyten und führt damit zur Astrogliose, die wiederum Einfluss auf die Aktivität der Mikroglia nimmt (GLASS et al., 2010; LIU, W. et al., 2011). Übermäßige Produktion von Zytokinen wird in direkte Verbindung mit Gedächtnisbeeinträchtigungen gebracht. So scheint beispielsweise die Erhöhung des Serumlevels von TNF- $\alpha$  gut mit der Zunahme kognitiver Defizite zu korrelieren (HOLMES et al., 2009). Zytokine beeinflussen auf unterschiedliche Art und Weise die Prozessierung von APP. Unter anderem kann die BACE1-Aktivität in Neuronen verstärkt und in Astrozyten initiiert werden (SASTRE et al., 2008; ZHAO et al., 2011). Eine neue Studie lässt vermuten, dass dabei die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Nukleärer Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) entscheidend ist (CHEN et al., 2012). Die daraus resultierende erhöhte A $\beta$ -Bildung bedingt einen Teufelskreis. Dementsprechend sind Therapiekonzepte entstanden, die die überschießende Entzündungsreaktion eindämmen sollen. Allerdings lieferten klinische Studien am Menschen überwiegend enttäuschende Ergebnisse (JATURAPATPORN et al., 2012). So konnten in Studien wie von PASQUALETTI et al. (2009) nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) das Fortschreiten kognitiver Defizite nicht verlangsamen. Vielversprechender als der akute therapeutische Einsatz von NSAIDs scheint die Senkung des Erkrankungsrisikos durch eine NSAID-Langzeiteinnahme zu sein. VLAD et al. (2008) schreiben dabei besonders Ibuprofen eine protektive Wirkung zu. Die Wahl des individuell am besten geeigneten Einsatzzeitpunktes sowie die Art und Dosierung von Entzündungshemmern bedarf jedoch noch weiterer intensiver Forschung.

#### **2.2.2.4 Oxidativer Stress**

Ein Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) einerseits und antioxidativen Mechanismen andererseits führt zu oxidativem Stress (BUTTERFIELD und SULTANA, 2011). Aufgrund ihrer Reaktivität können ROS und RNS eine Vielzahl zellulärer Komponenten, wie Nukleinsäuren,

Membranlipide oder Proteine, schädigen. Das Gehirn ist durch seinen hohen Gehalt ungesättigter Fettsäuren und den hohen Sauerstoffbedarf besonders anfällig für oxidative Schädigung (SULTANA et al., 2009; FINDER, 2010). Bemerkenswerterweise scheint oxidativer Stress eines der ersten frühen pathologischen Merkmale der AK zu sein (NUNOMURA et al., 2001). Bei Alzheimer-Patienten kann zerebral und systemisch eine Erhöhung oxidativer Stressmarker und eine Verringerung von Antioxidantien wie der Glutathion-Peroxidase oder Superoxid-Dismutase festgestellt werden (ANSARI und SCHEFF, 2010) (RINALDI et al., 2003). A $\beta$ -Oligomere binden vermutlich über einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus an neuronale Synapsen und bewirken mitochondriale Dysfunktionen sowie eine exzessive ROS-Bildung (DE FELICE et al., 2007). A $\beta$ 42-Oligomere können aber auch direkt über die leicht oxidierbare Aminosäure Methionin an Position 35 Lipidperoxidationen in Zellmembranen auslösen und in der Folge für weitere oxidative Schädigungen durch freie Radikale sorgen (BUTTERFIELD und SULTANA, 2011).

Oxidativer Stress kann Entzündungsprozesse auslösen, wird aber auch selbst von diesen unterhalten (HENSLEY, 2010). In aktivierter Mikroglia im Kortex von Alzheimer-Patienten kann korrelierend zu kognitiven Defiziten eine erhöhte Aktivität der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase nachgewiesen werden, welche durch Reduktion von Sauerstoff zum Superoxid-Anion zum oxidativen Stress beiträgt (ANSARI und SCHEFF, 2011). Dieser hat vielfältige schwerwiegende Auswirkungen, da durch die Oxidation von Zellkomponenten deren physiologische Funktion beeinträchtigt und der Zelltod gefördert wird (SULTANA et al., 2009). So geht die AK auch mit einer Schädigung und Reduktion der Anzahl von Mitochondrien einher (HIRAI et al., 2001). Dies führt zu einem beeinträchtigten Energiestoffwechsel mit einer verringerten Adenosintriphosphat (ATP)-Bildung, was zahlreiche Auswirkungen wie Synapsenverlust, Störung der Neurotransmitter-Synthese und der Kalzium (Ca<sup>2+</sup>)-Homöostase nach sich zieht (SULTANA et al., 2009). Oxidativer Stress kann letztlich über den intrinsischen Weg z. B. durch DNS-Schädigung, aber auch auf dem extrinsischen Weg über Protein p53 und Aktivierung der Kaspase-3 eine neuronale Apoptose induzieren (TAMAGNO et al., 2003; CAI et al., 2011).

#### **2.2.2.5 Veränderung der Neurotransmission**

Bei der AK ist die Neurotransmission in vielfältiger Weise beeinträchtigt. Auf unterschiedliche Art kommt es zur Schädigung und dem Verlust von Synapsen und Neuronen

und zur Beeinflussung verschiedener Rezeptoren und deren Signalkaskaden. Unphysiologische Neurotransmitter-Konzentrationen führen zu ausgeprägten Beeinträchtigungen der Integrität neuronaler Netzwerke und damit zu Störungen von Kognition und Verhalten. Neurotransmitter sind essentiell zur Informationsübertragung zwischen den Neuronen. Diese endogenen Botenstoffe werden durch präsynaptische Aktionspotentiale in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und binden an Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Dadurch kommt es entweder über die direkte Öffnung von Ionenkanälen (ionotroper Rezeptor) oder die Auslösung von Signalkaskaden (metabotroper Rezeptor) zu Änderungen des Membranpotentials. Dabei wird zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmittern unterschieden. Der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem ist Glutamat (REVETT et al., 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass A $\beta$ -Peptide die Freisetzung extrazellulären Glutamats verstärken können (KABOGO et al., 2010). Zusätzlich führen beeinträchtigte Glutamat-Transportmechanismen (MOOKHERJEE et al., 2011) und eine verringerte Aktivität der Glutamin-Synthetase (ROBINSON, 2001) zu einem stark erhöhten extrazellulären Glutamat-Gehalt im synaptischen Spalt im Rahmen der AK. Diese exzitotoxischen Mechanismen führen zur Dauererregung von NMDA-Rezeptoren und damit durch exzessive Erhöhung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen zum Zelltod (REVETT et al., 2012).

Als besonders ausgeprägt sind bei der AK Schäden im cholinergen System beschrieben. Cholinerge Zellverlust betrifft zunächst vor allem das cholinerge basale Vorderhirn, in dem cholinerge Projektionsneurone lokalisiert sind, die vor allem den Kortex und Hippokampus innervieren (WHITEHOUSE et al., 1982; SCHLIEBS und ARENDT, 2011). Es werden cholinerge Defizite, wie eine präsynaptisch verringerte Aktivität der Cholin-Acetyl-Transferase oder eine verringerte postsynaptische Kopplung des muskarinergen Acetylcholin (ACh)-Rezeptors M1 an Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) beschrieben (POTTER et al., 2011). Des Weiteren stört die Bindung von A $\beta$ -Peptiden an  $\alpha$ -7 nikotinergen ACh-Rezeptoren die Freisetzung von ACh und die Aufrechterhaltung der LTP (WANG, H. Y. et al., 2000). Es kommt also zu einer Beeinträchtigung der Signalkaskaden und letztlich auch der Kognition (SULTANA et al., 2009). Acetylcholinesterase-Hemmer reduzieren den Abbau von ACh im Gehirn und können so teilweise das Fortschreiten kognitiver Defizite in frühen Stadien der AK verlangsamen (SCHLIEBS und ARENDT, 2011).

Die kognitive Leistungsfähigkeit basiert auf der funktionellen Integrität und Plastizität neuronaler Netzwerke. Die AK geht jedoch mit einer erheblichen Beeinträchtigung von Synapsen und mit neuronalen Verlusten einher. Der Verlust von Synapsen stellt das wohl

beste neuropathologische Korrelat zu den kognitiven Defiziten dar (TERRY et al., 1991; QUERFURTH und LAFERLA, 2010).

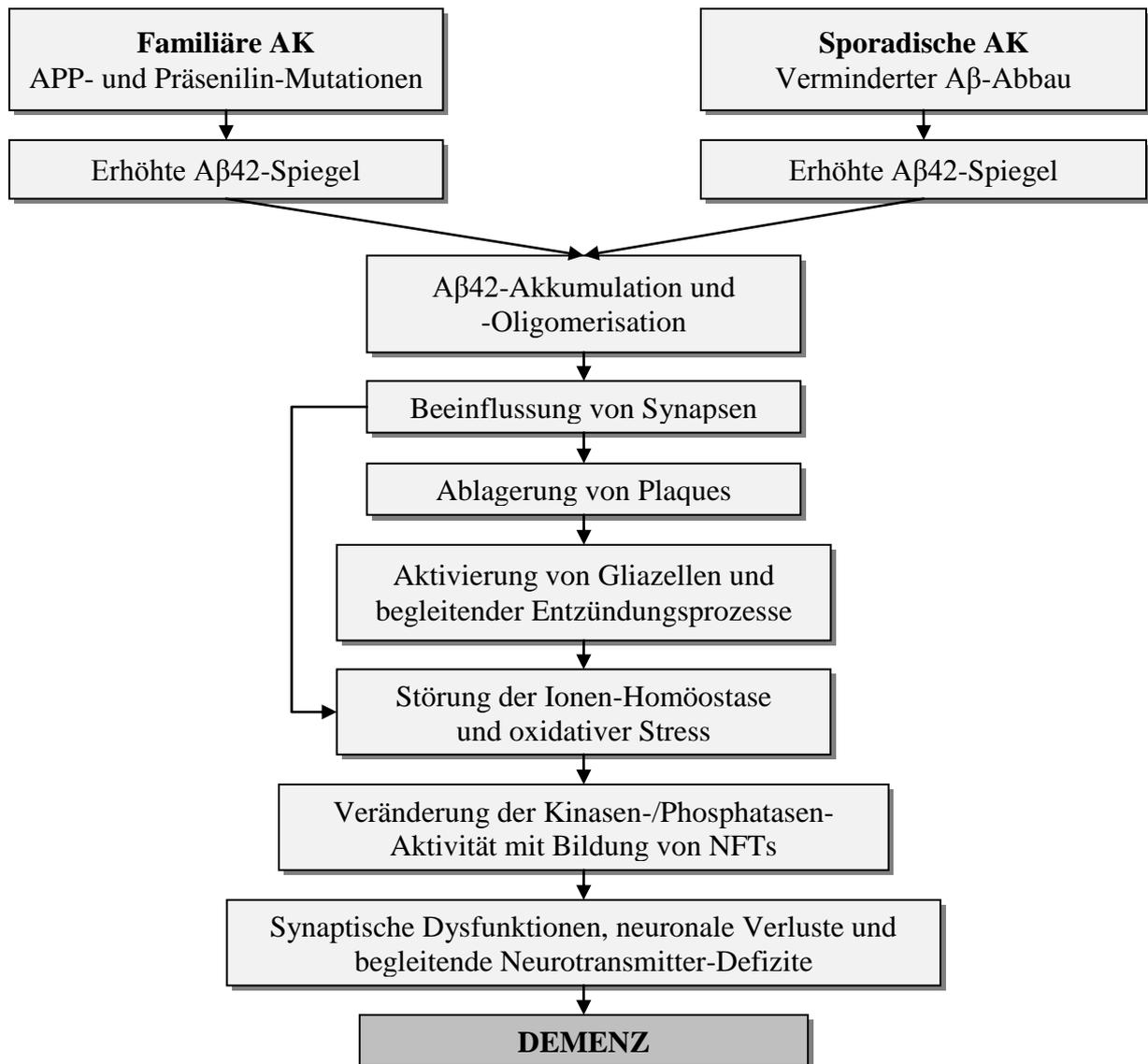
Neben dem bereits erwähnten oxidativen Stress stehen einige andere mögliche Ursachen als Auslöser für die synapto- und neurotoxischen Ereignisse in der Diskussion. Dabei scheint A $\beta$  selbst synaptotoxische Eigenschaften aufzuweisen. So ist im Mausmodell in der mit A $\beta$ -Oligomeren angereicherten direkten Umgebung der A $\beta$ -Plaques eine verringerte Anzahl exzitatorischer Synapsen nachweisbar (KOFFIE et al., 2009). Als zugrundeliegender Mechanismus spricht vieles für die sog. „Amyloid-Poren-Hypothese“. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie können in der Zellmembran von Neuronen A $\beta$ -Kanäle nachgewiesen werden, die die Integrität der Membran beeinflussen und so durch exzessiven Ca<sup>2+</sup>-Ionen Einstrom die Ionen-Homöostase der Zelle stören, was letztlich zur Apoptose führt (INOUE, 2008). Die Hypothese der porenbildenden Eigenschaft von A $\beta$ -Oligomeren konnte im Tiermodell untermauert werden (DEMURO et al., 2011). Weiterhin scheint A $\beta$  dystrophische Veränderungen an Neuriten durch Aktivierung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Phosphatase Kalzineurin bedingen zu können (WU et al., 2010). Zudem wird vermutet, dass A $\beta$ -Peptide direkt Ca<sup>2+</sup>-permeable Rezeptoren, wie verschiedene metabotrope und ionotrope Glutamat-Rezeptoren, aktivieren können (DE FELICE et al., 2007; ALBERDI et al., 2010). A $\beta$ -Oligomere können an die metabotropen Glutamat-Rezeptoren 5 (mGluR5) binden und eine pathologische Akkumulation derselben auslösen, was wiederum zu starker Erhöhung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen und damit zur Synaptotoxizität führt (RENNER et al., 2010). Die Bindung von A $\beta$ -Oligomeren an die sog. „NR1“-Untereinheit des ionotropen Glutamat-Rezeptors NMDA kann durch Antikörper gegen deren extrazelluläre Domäne inhibiert werden. Auch durch partielle Bindung des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantine kann eine pathologische Überaktivierung des NMDA-Rezeptors verhindert werden, während seine physiologische Funktion zur Induktion von LTP und damit für Lernvorgänge gewahrt bleibt. Memantine kann den fortschreitenden Gedächtnisverlust bei Alzheimer-Patienten verlangsamen und ist eines der wenigen in Deutschland zugelassenen Medikamente zur symptomatischen Behandlung der moderaten bis schweren AK (DE FELICE et al., 2007). Aber auch die exzessive Aktivierung der extrasynaptisch gelegenen sog. „NR2B“-Untereinheit des NMDA-Rezeptors durch A $\beta$ -Oligomere scheint eine Inhibition der LTP zu vermitteln (LI, S. et al., 2011). Eine andere Theorie beschreibt die durch Bindung von A $\beta$ -Oligomeren an  $\alpha$ -7 nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren ausgelöste Endozytose benachbarter NMDA-Rezeptoren (SNYDER et al., 2005). Zusätzlich kann es u. a. zu Veränderungen des  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptors, einem weiteren

ionotropen Glutamat-Rezeptor, kommen, indem die Kaspase-3-Aktivität im Rahmen der pathologischen Veränderungen der AK erhöht wird. Kaspase-3 führt zur Internalisation der sog. „GluR1“-Untereinheit des AMPA-Rezeptors, was ebenfalls die glutamaterge Neurotransmission beeinträchtigt (LI, Z. et al., 2010). Im Mausmodell Tg2576 ist die Aktivität der Kaspase-3 schon vor den ersten A $\beta$ -Ablagerungen im Gehirn erhöht und geht mit einer Verstärkung der LTD, einer Degeneration dendritischer Dornfortsätze sowie Gedächtnisdefiziten einher (D'AMELIO et al., 2011).

#### **2.2.2.6 Amyloid-Kaskaden-Hypothese**

Die Komplexität der Alzheimer-Krankheit und die noch heute fehlenden gesicherten Kenntnisse über die Zusammenhänge neuropathologischer Mechanismen spiegeln sich in der Entwicklung verschiedenster Hypothesen zur Krankheitsentstehung in den letzten zwei Jahrzehnten wider.

Im Jahr 1992 wurde erstmals die Amyloid-Kaskaden-Hypothese postuliert (HARDY, J. A. und HIGGINS, 1992). Auch wenn sie im Laufe der Jahre verschiedenen Modifikationen unterworfen war, basiert sie im Kern darauf, dass Änderungen im A $\beta$ -Metabolismus die zugrundeliegende Ursache aller weiterer pathologischer Veränderungen darstellen (HARDY, J. und SELKOE, 2002; HERRUP, 2010) (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese als klassische Theorie zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit: Änderungen im Aβ-Metabolismus lösen eine kaskadenartige Folge pathologischer Mechanismen aus, die zu Demenz führen (modifiziert nach HERRUP (2010)).**

Diese Hypothese wird besonders unterstützt durch die Entdeckung familiär gehäufte Fälle der AK, die auf Mutationen des APP-, PS1- oder PS2-Gens zurückzuführen sind. Diese bedingen eine veränderte APP-Prozessierung, wohingegen Mutationen im für das Tau-Protein kodierenden Gen zu frontotemporaler Demenz ohne Aβ-Ablagerungen führen (PIMPLIKAR, 2009; FINDER, 2010).

Allerdings widersprechen neuere Erkenntnisse in einigen Punkten der Amyloid-Hypothese (PIMPLIKAR, 2009). Beispielsweise werden zahlreiche Aβ-unabhängige Mechanismen beschrieben, die ebenfalls zu Demenz im Rahmen der AK führen (PIMPLIKAR et al., 2010).

Dementsprechend sollte nach PIMPLIKAR (2009) A $\beta$  nicht als der einzige auslösende Faktor, sondern vielmehr als einer von vielen zugrundeliegenden Faktoren der AK gesehen werden. Eine sehr kritische und kontroverse Stellung zur Amyloid-Hypothese nehmen LEE et al. (2007) ein, indem sie A $\beta$  als rein schützendes Agens und deren Bildung als Folge anderer Prozesse ansehen. Darüber hinaus wurden zahlreiche andere Modelle aufgestellt, die u. a. dem Tau-Protein, Entzündungsprozessen oder cholinergen Defiziten die zentrale Rolle zuweisen. Bislang kann allerdings keine Hypothese alle zusammenhängenden Pathomechanismen lückenlos erklären.

### **2.2.3 Klinisches Bild**

Die AK ist geprägt durch den fortschreitenden kognitiven Abbau, der die Alltagskompetenz zunehmend verringert und somit mit großen Belastungen für den Erkrankten und seine Bezugspersonen verbunden ist. Das Frühstadium der Erkrankung ist besonders durch die Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses gekennzeichnet. Es bereitet Schwierigkeiten, sich an kurz zurückliegende Ereignisse und neue Informationen zu erinnern. Dagegen erscheint das episodische Langzeitgedächtnis zur Erinnerung an weiter zurückliegende autobiographische Erlebnisse lange Zeit ungestört. Das semantische Langzeitgedächtnis für Faktenwissen ist allerdings schon in einem frühen Stadium beeinträchtigt. Im Zuge dessen treten vermehrt Sprachstörungen wie Wortfindungsprobleme auf. Aufmerksamkeit, Konzentrationsfähigkeit sowie räumliche und zeitliche Orientierungsfertigkeiten nehmen im Laufe der Erkrankung immer weiter ab. Teilweise sind auch sensorische Funktionen wie die visuelle, auditive und olfaktorische Wahrnehmung reduziert. Im Endstadium der Krankheit sind sämtliche kognitiven Funktionen stark beeinträchtigt (HODGES, J. R., 2006; MAIER et al., 2010; WESSON et al., 2011). Erschwerend können grobmotorische sowie feinmotorische Defizite hinzukommen (SCHRÖTER et al., 2003; SCARMEAS et al., 2004).

Unabhängig von den kognitiven Dysfunktionen treten bei bis zu 90 % der Erkrankten Verhaltensstörungen auf, die das tägliche Leben zusätzlich belasten (ROBERT et al., 2005). So kann die Realisation der nachlassenden Leistungsfähigkeit zu einem Gefühl der Hilflosigkeit und Scham führen, was von depressiven Störungen und Angstsymptomatik begleitet werden kann (MAIER et al., 2010). Die neuropsychiatrischen Symptome („behavioural and psychological symptoms of dementia“, BPSD) sind Folge pathologischer neuroanatomischer und biochemischer Veränderungen sowie der gegebenen Umweltfaktoren. Die häufigsten BPSD im Rahmen der AK sind Apathie, Agitation, Reizbarkeit und

Aggression, Schlafstörungen, psychomotorische Auffälligkeiten wie zielloses Herumirren, Angst, Depression, Euphorie, Enthemmung, Halluzinationen, Wahnvorstellungen und Essstörungen (ROBERT et al., 2005; AALTEN et al., 2007; MAIER et al., 2010).

#### **2.2.4 Risikofaktoren**

Die Ätiologie der AK konnte bislang nur teilweise geklärt werden. Sicher ist, dass verschiedene genetische Hintergründe und Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Angesichts der mit dem Alter rapide zunehmenden Prävalenz und Inzidenz muss das Alter selbst als größter Risikofaktor betrachtet werden (REVETT et al., 2012). Wie bereits angedeutet, sind zahlreiche autosomal-dominant vererbte Mutationen bekannt, die für die Entstehung einer familiären Form der AK verantwortlich sind. Dabei handelt es sich überwiegend um Mutationen im PS1-Gen, in geringerer Zahl auch im PS2- und APP-Gen. Diese Mutationen bewirken entweder eine generell vermehrte A $\beta$ -Entstehung oder eine Erhöhung des A $\beta$ 42/A $\beta$ 40-Verhältnisses (FINDER, 2010). Die familiäre Form der AK ist gegenüber der sporadischen Form durch einen früheren Beginn der Erkrankung bereits im Alter von 30-60 Jahren charakterisiert. Wenngleich nur etwa 2 % aller Alzheimer-Fälle auf diese bekannten Mutationen zurückzuführen sind, leisten sie doch einen großen wissenschaftlichen Beitrag zur Erforschung der viel häufigeren sporadischen Form der AK. Erst die Entdeckung dieser Genmutationen erlaubte beispielsweise die Erzeugung transgener Mausmodelle der AK (LAGE, 2006). Ein anerkannter genetischer Risikofaktor ist das  $\epsilon$ 4-Allel des Apolipoproteins E (ApoE). ApoE wird im Gehirn hauptsächlich von Mikroglia und Astrozyten gebildet und ist am Fettstoffwechsel beteiligt. Den verschiedenen ApoE-Allelen werden noch weitere Funktionen zugeschrieben (GLASS et al., 2010). So wird vermutet, dass die Expression von ApoE4 entzündungsfördernd wirkt (VITEK et al., 2009), den Abbau von A $\beta$ -Peptiden reduziert und deren Aggregation verstärkt (REIMAN et al., 2009).

Zahlreiche weitere Faktoren stehen im Verdacht, das Risiko für die Erkrankung an Alzheimer zu erhöhen. Häufig genannt werden ein niedriger Bildungsstand, geringe körperliche und geistige Aktivität im Alter, chronischer Stress, hohe Cholesterinwerte, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen und Schädel-Hirn-Traumata (FINDER, 2010; ROTHMAN und MATTSON, 2010; REVETT et al., 2012).

Vielfach wird vermutet, dass das weibliche Geschlecht einen zusätzlichen Risikofaktor darstellt. Etwa 70 % der Erkrankten sind Frauen, was allerdings wohl primär durch die allgemein höhere Lebenserwartung gegenüber Männern bedingt ist. Zudem scheinen Frauen

mit einer Demenz länger zu überleben (BICKEL, 2012). Während zwar manche Studien ein erhöhtes Erkrankungsrisiko von Frauen anzweifeln (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2012), dokumentieren andere Studien vor allem in den höchsten Altersgruppen neben einer signifikant gesteigerten Prävalenzrate (ALZHEIMER EUROPE, 2009) auch ein erhöhtes Neuerkrankungsrisiko von Frauen (SCHMIDT et al., 2008).

### **2.2.5 Besondere Bedeutung des Geschlechts**

Neben einer erhöhten Inzidenz und Prävalenz liefern auch die Ergebnisse der Pathologie zusätzliche Hinweise für eine höhere Krankheitsanfälligkeit von Frauen. So sind in einer groß angelegten Studie mit über 5000 Autopsien frühe Stadien der NFT-Ablagerung bei Frauen mit dem Auftreten von wesentlich mehr Plaques verbunden als bei Männern (CORDER et al., 2004). In einer Studie von BARNES et al. (2005) weisen weibliche Gehirne die für AD typischen pathologischen Merkmale, insbesondere NFTs, in einem höheren Ausmaß auf als männliche Gehirne. Besonders eindrucksvoll und erstmals gezeigt ist aber die Tatsache, dass Frauen bei gleichermaßen ausgeprägten pathologischen Veränderungen eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit haben, klinische Symptome einer Demenz zu zeigen.

Auch anhand der Symptomatik lassen sich geschlechtsbezogene Differenzen feststellen: Bei den Verhaltensstörungen zeigen Frauen mit AK häufiger ein depressives, Männer hingegen ein aggressives Verhalten (SCHMIDT et al., 2008). Des Weiteren überleben Frauen zwar länger mit der Krankheit, weisen aber im selben Krankheitsstadium stärkere kognitive Beeinträchtigungen auf als Männer (SINFORIANI et al., 2010; CHAPMAN, R. M. et al., 2011; IRVINE et al., 2012). IRVINE et al. (2012) vermuten, dass der stärkere kognitive Abbau bei Frauen besonders im frühen Krankheitsstadium rascher voranschreitet als bei Männern. Untersuchungen zeigen sowohl an Gesunden wie auch an Alzheimer-Erkrankten einen Nachteil des weiblichen Geschlechts bei räumlicher Orientierung. Während sich allerdings gesunde ältere Frauen durch einen Leistungsvorteil hinsichtlich Sprache und verbalem Gedächtnis auszeichnen, weisen sie, wenn sie von der AK betroffen sind, überraschenderweise auch in diesem Bereich mehr Defizite auf als Männer (SCHMIDT et al., 2008; IRVINE et al., 2012).

Ein möglicher Interpretationsansatz für die kognitiven Befunde ist das Konzept einer größeren kognitiven Reserve bei Männern. Dieses Konzept beschreibt schützende und ausgleichende Mechanismen bei pathologischen und altersabhängigen Veränderungen im Gehirn. Demnach sollen neuronale Netzwerke, die besonders effizient arbeiten und eine hohe Kapazität

aufweisen, weniger anfällig für Störungen sein - und alternative Netzwerke sollen auftretende pathologische Veränderungen in einem gewissen Maß kompensieren können (STERN, 2006). Einen Hinweis auf größere kognitive Reserven beim männlichen Geschlecht liefert eine Studie von PERNECZKY et al. (2007), in der Männer trotz deutlich schwächerem zerebralem Metabolismus die gleichen kognitiven Leistungen zeigen wie Frauen.

Weitere sexuelle Dimorphismen wie eine höhere Schädigungsanfälligkeit des für Gedächtnisfunktionen wichtigen cholinergen basalen Vorderhirns sind bei an der AK verstorbenen Frauen beschrieben. Dabei kommt es zu einer verringerten Expression des Tyrosinkinase-Rezeptors des Nervenwachstumsfaktors (COUNTS et al., 2011). Auch scheint oxidativer Stress, der eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AK spielt, bei weiblichen Alzheimer-Patienten stärker zu sein (SCHUESSEL et al., 2004). Das Alter ist der größte Risikofaktor der AK. Eine der natürlichen Konsequenzen des Alterns stellt die Abnahme von Sexualhormonen dar. Da Geschlechtshormone zahlreiche protektive Funktionen zugeschrieben werden, sehen zahlreiche Studien die Abnahme der Sexualhormone als eine Hauptursache für die erhöhte AK-Anfälligkeit im Alter. Im Unterschied zur langsamen, graduellen Abnahme des primären männlichen Geschlechtshormons Testosteron kommt es bei Frauen in der Menopause zu einem deutlich ausgeprägteren Abfall der weiblichen Geschlechtshormone Östradiol und Progesteron (VEST und PIKE, 2012).

Östrogene wirken auf verschiedene Art schützend vor der AK. Zusammengefasst verbessern sie die Kognition, schützen vor neuronalem Zelltod und reduzieren bestimmte neuropathologische Kennzeichen der AK (VEST und PIKE, 2012). Beispielsweise regulieren sie im Hippokampus die synaptische Plastizität, indem sie die Synapsendichte und Expression von Glutamat-Rezeptoren erhöhen und damit die LTP verstärken (LIU, F. et al., 2008). Die Mitochondrien junger Frauen werden durch Östrogene vor negativen A $\beta$ -Wirkungen geschützt, indem Östrogene vermehrt antioxidative Mechanismen aktivieren und apoptotische Signale reduzieren (BORRAS et al., 2005; VINA und LLORET, 2010). Des Weiteren scheinen Östrogene entzündungshemmende Eigenschaften aufzuweisen (VINA und LLORET, 2010). Vor allem aber beeinflussen sie die APP-Prozessierung, fördern den A $\beta$ -Abbau über Aktivierung verschiedener Enzyme und können in vitro die A $\beta$ -Oligomerisierung verhindern (MORINAGA et al., 2011; VEST und PIKE, 2012).

Tatsächlich weisen an Alzheimer erkrankte Frauen im Vergleich zu gesunden Personen niedrigere Östradiol-Werte in Serum (MANLY et al., 2000) und Gehirn (ROSARIO et al., 2011) auf. Als Konsequenz wurden verschiedene Studien initiiert, die die Auswirkungen einer

Hormonersatztherapie (HET) untersuchen sollten. Dabei kam es allerdings zu kontroversen Ergebnissen. In epidemiologischen Studien wie von ZANDI et al. (2002) war eine HET bei Frauen mit einer verringerten Inzidenz der AK assoziiert. Leider konnte die positive Wirkung der HET in der „Women’s Health Initiative Memory Study“, einer großen klinischen Studie, nicht bestätigt werden. Frauen in der Postmenopause erhielten konjugiertes equines Östrogen in Kombination mit Medroxyprogesteron. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe statt eines verringerten, sogar ein erhöhtes Risiko für eine Demenz (SHUMAKER et al., 2003). Studien legen nahe, dass für eine positive Hormonwirkung u. a. die Zusammensetzung, Applikationsform und Periodizität der Einnahme eine wichtige Rolle spielen (VEST und PIKE, 2012). Zudem wird ein kritisches Zeitfenster vermutet, so dass nur eine frühzeitige HET bei Beginn der Menopause positive Auswirkungen hat, während eine Östrogen-Einnahme erst Jahre später keine oder sogar negative Folgen haben kann (ZANDI et al., 2002; VEST und PIKE, 2012). Darüber hinaus müssen aber auch anderen Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse Beachtung finden (WEBBER et al., 2007).

Das wachsende Verständnis für die geschlechtsbezogenen Unterschiede im Komplex der AK ist essentiell für die Entwicklung spezifischer präventiver und therapeutischer Strategien (BARNES et al., 2005).

### **2.2.6 Transgene Mausmodelle**

Transgene Mausmodelle, die verschiedene spezifische Aspekte der Neuropathologie und der Gedächtnis- und Verhaltensbeeinträchtigungen der AK des Menschen widerspiegeln, basieren auf der Überexpression humaner APP-Transgene. Dabei werden Mutationen der familiären AK Modell-spezifisch durch transgene PS-Mutationen ergänzt. Das erste transgene Mausmodell der AK, das sog. „PDAPP-Mausmodell“ (GAMES et al., 1995), überexprimiert ein humanes APP-Transgen, bei dem - unter Kontrolle eines Wachstumsfaktors („Platelet-derived Growth Factor  $\beta$ “, PDGF- $\beta$ ) als Promotor - durch Punktmutation an der Stelle 717 die Aminosäure Valin durch Phenylalanin ausgetauscht ist (V717F). Dieses Modell zeichnet sich u. a. aus durch die progressiv fortschreitenden extrazellulären A $\beta$ -Ablagerungen ab einem Alter von sechs Monaten, durch das Auftreten dystrophischer neuritischer Komponenten, extensiver Mikrogliose, Astrogliose und Synapsenverlust (GAMES et al., 1995), wohingegen der beim Menschen typische Neuronenverlust ausbleibt (IRIZARRY et al., 1997b). Altersabhängige Lerndefizite werden ebenso beschrieben wie Verhaltensbeeinträchtigungen,

z. B. Störungen des Schlafrhythmus der transgenen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (HUITRON-RESENDIZ et al., 2002).

Läsionen ähnlich den NFTs zeigt das dreifach transgene Mausmodell von ODDO et al. (2003), das auf PS1-, APP- und Tau-Mutationen basiert. Dabei treten altersabhängige synaptische Dysfunktionen, gefolgt von extra- und intraneuronalen A $\beta$ -Ablagerungen und schließlich pathologischen Änderungen des Tau-Proteins auf.

Das am häufigsten genutzte transgene Mausmodell der AK ist das Modell Tg(HuAPP695.K670N-M671L)2576, im Weiteren als Tg2576 bezeichnet, das 1996 von Karen Hsiao an der Universität von Minnesota entwickelt wurde (SCHAEFFER et al., 2011). Für den gemischten genetischen Hintergrund dieses Mausmodells wurden C57B6/SJL-Mäuse der zweiten Filialgeneration (F2) mit C57B6-Tieren rückgekreuzt. Das Genom der Tg2576-Tiere enthält das humane APP695-Gen mit einer Doppelmutation, bei der an der Stelle 670 die Aminosäure Lysin durch Asparagin und an der Stelle 671 Methionin durch Leucin ausgetauscht sind (K670N-M671L) (HSIAO et al., 1996). Diese sog. „schwedische Doppelmutation“ wurde 1992 als genetische Ursache der familiären Frühform der AK zweier großer schwedischer Familien entdeckt (MULLAN et al., 1992). Die N-terminale Doppelmutation beeinflusst die enzymatische Prozessierung des APPs, indem sie die Affinität der  $\beta$ -Sekretase zu ihrem Substrat erhöht und damit die A $\beta$ -Bildung fördert (VASSAR et al., 1999). Das genetische Konstrukt steht unter Kontrolle eines neuronenspezifischen Hamster-Prion-Protein-Promotors, der eine fünffache Überexpression des humanen APPs im Vergleich zu dem endogenen murinen APP bewirkt. Dies resultiert in altersabhängig erhöhten A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Spiegeln (HSIAO et al., 1996). Nach etwa acht Monaten sind im Tg2576-Modell die ersten vereinzelt Plaques im Gehirn zu sehen, deren Anzahl erst mit zwölf Monaten rapide ansteigt (CALLAHAN et al., 2001; KAWARABAYASHI et al., 2001). Synaptische sowie mitochondriale Dysfunktionen, die mit beeinträchtigtem Energiestoffwechsel einhergehen, sind beschrieben (CALKINS et al., 2011; TRUSHINA et al., 2012). Ebenso kommt es, wie auch bei Alzheimer-Patienten, zur Aktivierung von Gliazellen und zur Induktion inflammatorischer Mechanismen (APELT und SCHLIEBS, 2001). Im Gegensatz zum menschlichen Gehirn sind aber keine Verluste von Neuronen im Hippokampus feststellbar (IRIZARRY et al., 1997a). Es wird eine progressive kognitive Verschlechterung der Tiere beschrieben, die bis zu einer globalen Demenz führt. Dabei sind Hippokampus-abhängige Defizite und beeinträchtigte LTP bereits vor Einsetzen der A $\beta$ -Ablagerung feststellbar (JACOBSEN et al., 2006; MIDDEI et al., 2006). Die kognitiven Defizite scheinen dabei insbesondere durch lösliche A $\beta$ -Oligomere bedingt zu sein (LESNE et al., 2006).

Bei Durchsicht der vorhandene Literatur wird klar, dass ein Großteil der Studien das Geschlecht der Tiere bei der Auswertung von Daten entweder gar nicht berücksichtigt oder von vornherein nur ein Geschlecht eingesetzt hat, was den Vergleich zwischen Studien erschwert. So beschreiben STEWART et al. (2011) in einer systematischen Übersichtsarbeit über räumliche Gedächtnisdefizite des Tg2576-Mausmodells anhand verschiedener Verhaltenstests einen Mangel an ausreichenden Daten, um eine geschlechtsbezogene Analyse durchführen zu können. Auch existieren keine Studien, die sich gezielt mit den altersabhängigen Auswirkungen des Geschlechts des Tg2576-Modells auf physiologische, neuropathologische, kognitive und Verhaltensparameter beschäftigen.

Angesichts der stetig steigenden Zahl an Fällen der AK, den schwerwiegenden Konsequenzen dieser Krankheit und der potentiell wichtigen Rolle des Geschlechts erscheint es besonders wichtig, ein Mausmodell der AK unter dem Aspekt des Geschlechts zu charakterisieren. Hierbei sollten insbesondere kognitive Dysfunktionen als Hauptmerkmale der AK mittels Verhaltenstest geschlechtsbezogen ermittelt werden. Dies kann ein wichtiger Schritt sein, um zum weiteren Verständnis dieser komplexen, multifaktoriell bedingten Krankheit beizutragen.

## **3 Eigene Untersuchungen**

### **3.1 Zielvorstellung**

Mit dieser Studie soll das transgene Tg2576-Mausmodell, das das menschliche Gen für APP695 mit der schwedische Doppelmutation (K670N-M671L) der familiären Alzheimer-Krankheit überexprimiert, unter Vergleich der Geschlechter umfassend phänotypisch charakterisiert werden. Ziel ist es, ein Tiermodell so zu charakterisieren, dass damit zugrundeliegende Pathomechanismen der Alzheimer-Krankheit geschlechtsbezogen genauer untersucht und potentielle therapeutische Strategien präklinisch überprüft werden können.

### **3.2 Material und Methoden**

#### **3.2.1 Versuchstiere**

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert am 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934)) durch die Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-1-10 und 55.2-1-54-2532-149-11) genehmigt.

##### **3.2.1.1 Herkunft**

Für die Studie wird das transgene Tg(HuAPP695.K670N-M671L)2576-Mausmodell, kurz Tg2576, verwendet. In einem separaten Zuchtraum werden die Mäuse entsprechend der Angaben des Anbieters dieser Tiere (Taconic Europe, Lille Skensved, Dänemark) gezüchtet. Die männlichen hemizygoten Tg2576-Elterntiere stammen von Taconic Europe, während die weiblichen C57B6/SJL-Zuchttiere der ersten Filialgeneration (F1) von Jackson Laboratory (Maine, USA) über Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen werden. Das Zuchtalter der männlichen wie weiblichen Tiere liegt bei über 8 Wochen. Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche werden ein oder zwei Weibchen in den Käfig eines Männchens zur Verpaarung verbracht. Treten die ersten Anzeichen einer Trächtigkeit wie Gewichtszunahme, Anbildung des Gesäuges und Nestbautätigkeit auf, werden die Mäuse getrennt und einzeln gesetzt. Nach einer Tragzeit von ca. 18 bis 21 Tagen werden die Nachkommen im Alter von 21 Tagen abgesetzt. Im Zuge des Absetzens wird zur

Kennzeichnung der Tiere mit Hilfe einer Kerbzange unter Isofluran-Narkose Gewebe der Ohrmuschel als individuelle Ohrmarkierung ausgestanzt. Anhand des Ohrbiopats werden die Nachkommen in einem Fremdlabor (Charles River Laboratories, L'Arbresle Cedex, Frankreich) mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion auf das humane Transgen und einen Gendefekt als Auslöser einer Retinadegeneration (rd1-Mutation des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der Stäbchen-Phosphodiesterase 6, Pde6b<sup>rd1</sup>) genotypisiert.

### **3.2.1.2 Haltungsbedingungen**

Frühestens im Absetzalter, aber spätestens einen Monat vor Beginn des Verhaltenstests, werden die Mäuse aus dem Zuchtraum in einen speziellen Tierhaltungsraum verbracht, in dem alle Verhaltensuntersuchungen stattfinden. So wird darauf geachtet, dass sich die Tiere frühzeitig an den Haltungsraum akklimatisieren können und von der Ankunft bis zur Euthanasie in ihrer gewohnten Umgebung nach Möglichkeit ohne Wechsel des einmal zugeteilten Käfigstandortes und ohne Änderung der Gruppenzusammenstellungen verbleiben können. Um einen gleichförmigen, stressarmen Arbeitsablauf bei den täglichen Kontrollen, der Versorgung, dem Kontakt mit den Tieren und den Verhaltensuntersuchungen zu gewährleisten, ist immer dieselbe Person mit diesen Aufgaben betraut.

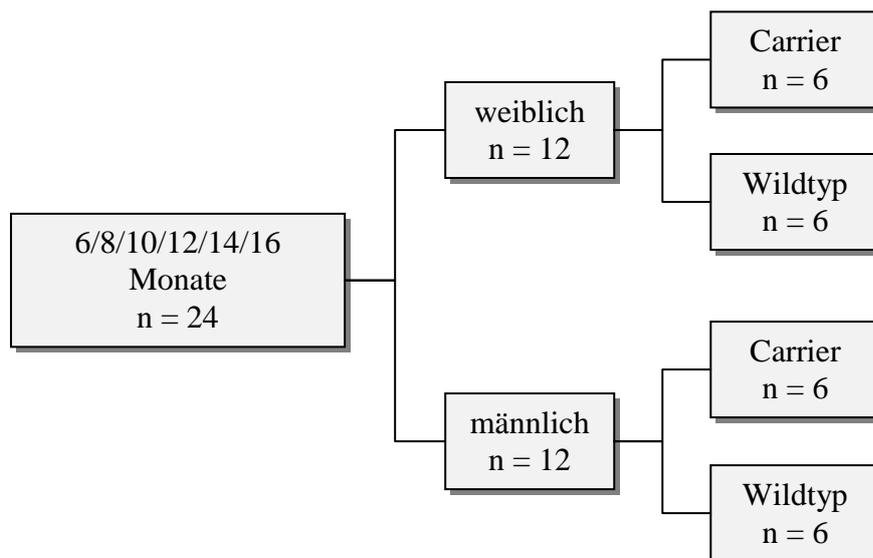
Die Mäuse werden in einem für Tierhaltung konzipierten Raum gemäß den gesetzlich geregelten Sicherheitsmaßnahmen für Tierhaltungsräume zur Haltung genetisch veränderter Tiere der Sicherheitsstufe 1 (Gentechnik-Sicherheitsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. März 1995 (BGBl. I S. 297), zuletzt geändert am 18. Dezember 2008 (BGBl. I S. 2768)) gehalten. Der Raum ist entsprechend der Standardbedingungen nach den Empfehlungen für Versuchstierhaltung (AUSSCHUSS FÜR AUSBILDUNG UND TIERGERECHTE HALTUNG DER GV-SOLAS - GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE, 1988) vollklimatisiert. Die Raumtemperatur beträgt  $22 \pm 2$  °C bei einer relativen Luftfeuchte von  $60 \pm 15$  % und konstantem Luftwechsel. Eine Zeitschaltautomatik sorgt für einen natürlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden. Die Dunkelphase, die der Aktivitätsphase von Mäusen entspricht, dauert von 15:00 Uhr bis 03:00 Uhr. Die Tiere werden in Laborstandardkäfigen (Makrolonkäfig Typ II) gehalten, wobei die Weibchen in Dreiergruppen untergebracht sind. Männliche Mäuse müssen einzeln gehalten werden, da männliche geschlechtsreife Tg2576-Tiere untereinander aggressiv reagieren und sich gegenseitig verletzen.

Als Einstreu dienen staubarme, autoklavierte Weichholzfaser (Lignocel<sup>®</sup>, Fa. J. Rettenmaier & Söhne GmbH und Co. KG, Rosenberg). Zur Beschäftigung und als Nestbaumaterial erhalten alle Tiere zusätzlich Zellstoff und autoklaviertes Heu. Ein Käfigwechsel inklusive frischer Einstreu sowie frischem Wasser findet zweimal pro Woche statt. Ein Alleinfuttermittel in Pelletform (Altromin<sup>™</sup> Haltungsdiät, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) steht den Mäusen ad libitum zur Verfügung, genauso wie Leitungswasser, das über Nippeltränken angeboten wird.

Das Hygienemanagement erfolgt gemäß den Empfehlungen der „Federation of Laboratory Animal Sciences Association“ (FELASA). Dabei werden vierteljährlich Untersuchungen auf pathogene Erreger durchgeführt.

### 3.2.2 Versuchsplan

Für die Studie werden insgesamt 144 Mäuse in 24 verschiedenen Versuchsgruppen, unterteilt in sechs Alterskohorten, vergleichend untersucht: 6, 8, 10, 12, 14 und 16 Monate alte Tiere. Jede Alterskohorte besteht aus zwölf weiblichen und zwölf männlichen Tieren, wovon jeweils sechs Tiere Träger des Transgens sind (sog. „Carrier“) und sechs das Transgen nicht tragen (sog. „Wildtypen“). Dadurch ergeben sich vier Untergruppen je Alterskohorte und somit bei sechs Alterskohorten insgesamt 24 verschiedene Versuchsgruppen (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Einteilung der 24 Versuchstiere je Alterskohorte (6/8/10/12/14/16 Monate) in die 4 Untergruppen (weibliche Carrier, weibliche Wildtypen, männliche Carrier, männliche Wildtypen)**

Der Versuch gliedert sich in zwei Phasen, dem Verhaltenstest und der postmortalen Gehirnuntersuchung auf die Expression des metabotropen Glutamat-Rezeptors 5 (mGluR5), des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors mit der NR2B-Untereinheit (NMDAR-NR2B) und des peripheren Benzodiazepin-Rezeptors (PBR).

Das Gewicht aller Tiere wird einmal monatlich zur Überwachung des Gesundheitsstatus und zur Gewöhnung an die Waage erfasst. Während der Testperiode im modifizierten Hole-Board-Test (mHBT) werden die Mäuse täglich gewogen.

Bereits vier Tage vor Beginn des mHBTs werden die Mäuse der jeweiligen Versuchsgruppe an Mandelstückchen gewöhnt, die im Test als Futterbelohnung dienen. Dabei bekommt jedes Tier an allen vier Tagen zu Beginn der Dunkelphase zwölf Mandelstückchen in seinem Käfig angeboten, was der maximalen Menge entspricht, die sich ein Tier pro Tag im mHBT erarbeiten kann.

Der eigentliche Verhaltenstest wird acht Tage lang jeweils zur gleichen Uhrzeit durchgeführt. Pro Tag muss jede Maus jeweils vier Durchläufe mit einer Dauer von je maximal fünf Minuten absolvieren. Am neunten Tag, einen Tag nach Ende der Verhaltensuntersuchung, werden die Versuchstiere zur Probenentnahme getötet.

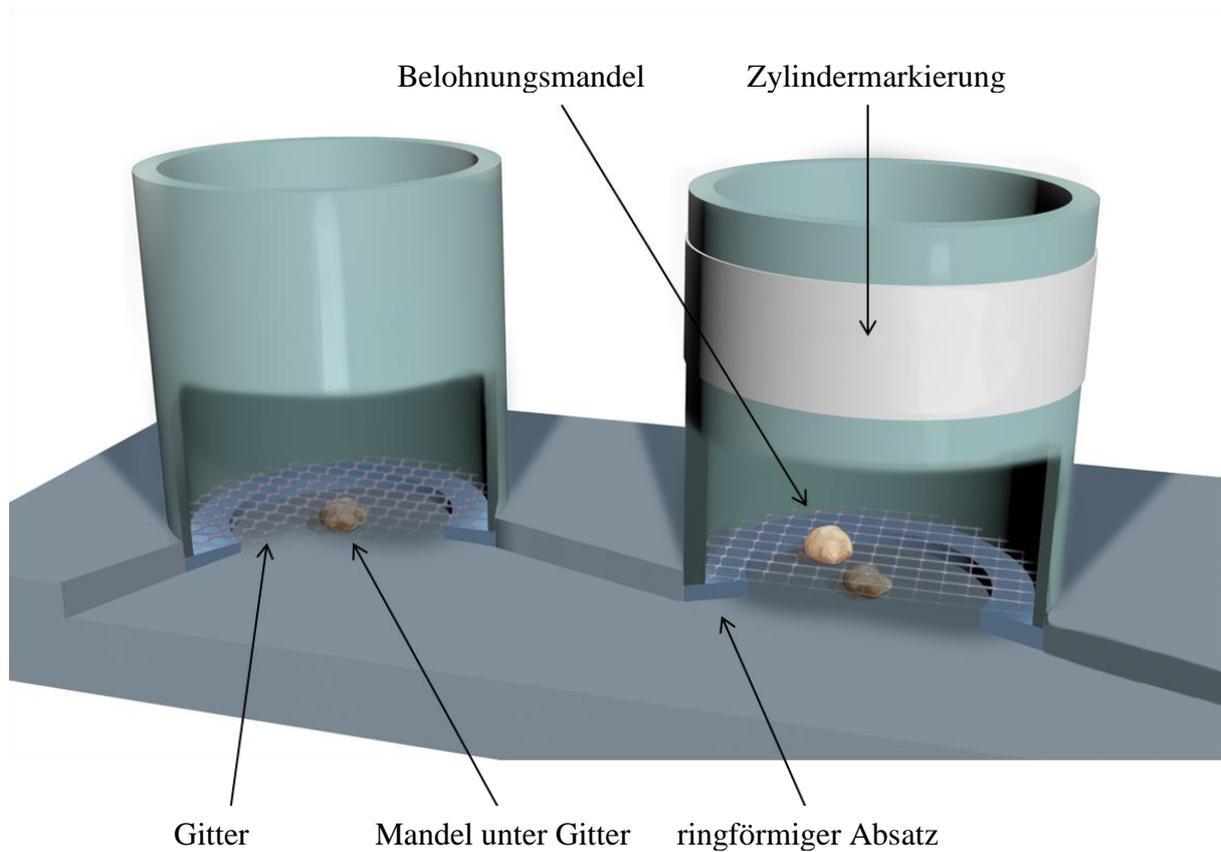
### **3.2.3 Modifizierter Hole-Board-Test**

Im Rahmen der kognitiven Verhaltensuntersuchung der Mäuse wird der mHBT immer von derselben Person durchgeführt um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

#### **3.2.3.1 Versuchsaufbau**

Der Verhaltenstest findet in einer quadratischen Box statt. Im ungeschützten Zentrum dieses offenen Feldes liegt das für Mäuse entwickelte Hole-Board (modifiziert nach OHL et al. (2003)), das aus undurchsichtigem, grauem Polyvinylchlorid (PVC) mit den Maßen 35 x 18 x 1 cm besteht (eigene Herstellung der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“, Klinikum rechts der Isar, München). Auf diesem Brett sind in zwei parallelen Reihen jeweils fünf 0,3 cm tiefe Löcher mit einem Durchmesser von 3,2 cm eingelassen, die einen äußeren ringförmigen Absatz aufweisen, auf den die 3,4 cm hohen, grauen PVC-Zylinder passgenau aufgesteckt werden können. Alle zehn Löcher werden mit einem Mandelstück (etwa 0,05 g) (Mandeln gehackt, Dr. Oetker, Bielefeld) versehen, wobei ein feinmaschiges Gitter in Lochgröße auf den ringförmigen Absatz gelegt wird, das die Mandeln für die Tiere

unerreichbar macht. Jeweils drei der Zylinder werden außen ringsum mit einem weißen Klebeband (1 cm Breite) als optische Markierung versehen. Nur diese drei gekennzeichneten Zylinder werden mit jeweils einem Mandelstück als Futterbelohnung erreichbar oberhalb des Gitters bestückt (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung eines unmarkierten (links) und markierten (rechts) Zylinders im Querschnitt auf dem Hole-Board (Grafik: in Zusammenarbeit mit Daniel Klenk, München)**

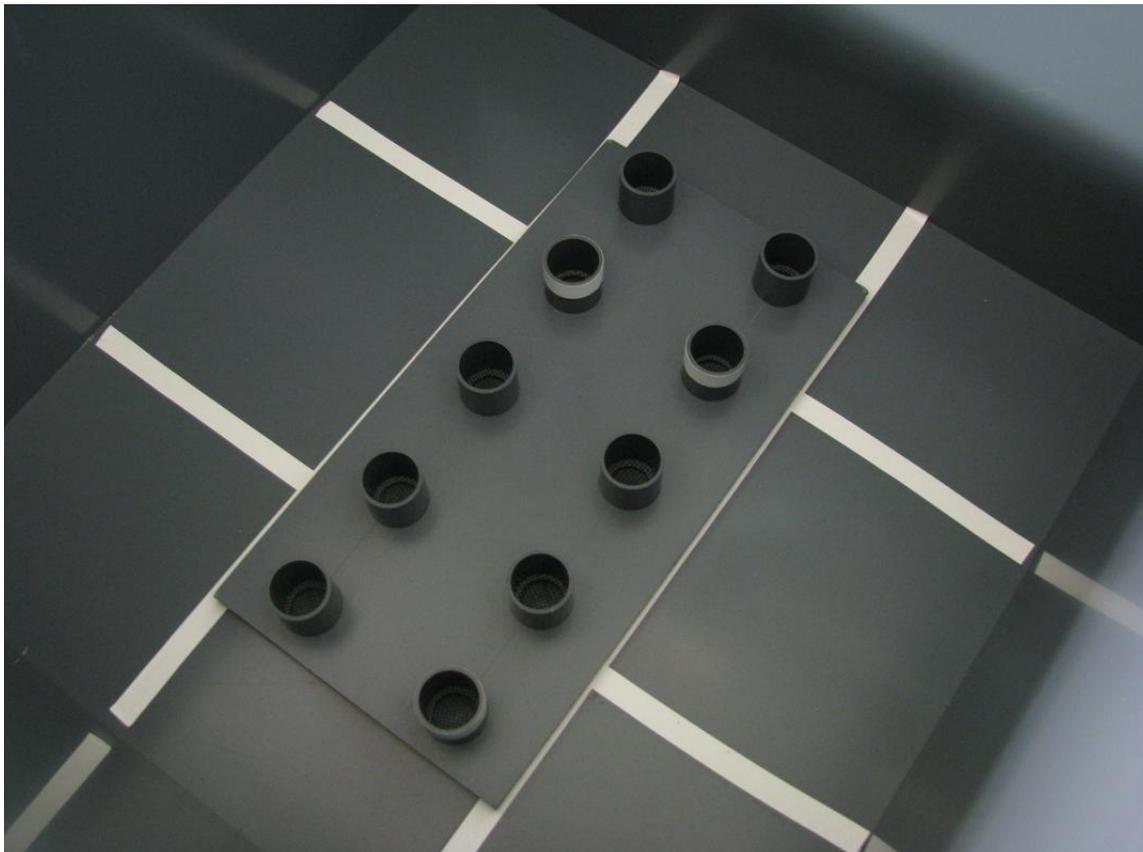
Die Verteilung der markierten Zylinder wechselt an jedem Versuchstag nach einem randomisierten Schema, bleibt aber innerhalb der vier Durchläufe eines jeden Tieres pro Tag konstant (siehe Tabelle 1).

***Tabelle 1: Randomisierte Anordnung der drei markierten Zylinder im mHBT***

<b>Versuchstag</b>	<b>Lochnummern</b>
Tag 1	2 / 7 / 8
Tag 2	1 / 4 / 9
Tag 3	3 / 5 / 8
Tag 4	1 / 4 / 10
Tag 5	2 / 5 / 9
Tag 6	3 / 6 / 9
Tag 7	4 / 8 / 10
Tag 8	2 / 5 / 8

***(nach Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesiologie“, Klinikum rechts der Isar, München)***

Das Hole-Board liegt zentriert auf dem Boden einer wiederum aus grauem PVC bestehenden, nach oben offenen, quadratischen Box mit einer äußeren Kantenlänge von jeweils 52 cm. Der Boden der Box ist mit weißem Klebeband (1 cm Breite) in neun gleichgroße Quadrate (ca. 16 x 16 cm) unterteilt (siehe Abbildung 7).



***Abbildung 7: Modifiziertes Hole-Board bestehend aus Versuchsarena und zentral liegendem Hole-Board mit den zehn aufgesteckten Zylindern***

Der mHBT ist als räumlich-sensorisch orientierter Verhaltenstest ausgelegt. Damit alle Löcher gleichermaßen riechen und die Tiere die Futterbelohnungen nicht mit Hilfe ihres Geruchsinnes zu finden vermögen, wird unter das Gitter jeden Zylinders ein Mandelstückchen gelegt und auch jeder Zylinder vor jedem neuen Durchlauf an der Innenseite mit 0,3 % Vanillearomalösung (Th. Geyer GmbH & Co.KG, Höxter-Stahle) bestrichen. Mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (The Observer® 5.0, Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) können die beobachteten Aktivitäten der Maus zeitkorreliert in einer Textdatei erfasst werden. Dazu sind verschiedene Befehle definiert (siehe Tabelle 2), die der Untersucher mittels einer geräuscharmen Tastatur aus Silikon (Foldable Keyboard “Fold-2000“, Taiwan) eingibt. Es werden die Art der Aktion, der Zeitpunkt des Auftretens und gegebenenfalls die Dauer festgehalten.

**Tabelle 2: Tastaturbefehle und deren Bedeutung im mHBT**

<b>Aktion</b>	<b>Tastenbelegung</b>	<b>Definition</b>
Start des Tests	Return	Loslassen der Maus in der Box
Betreten des Boards	r	Zielgerichtetes Betreten des Boards mit mindestens einer Vorderpfote
Verlassen des Boards	v	Zielgerichtetes Verlassen des Boards mit beiden Vorderpfoten
Korrektes Loch (1, 2 oder 3)	f, g, h	Aktives Aufsuchen eines der drei markierten Löcher (1, 2 oder 3), das noch die Futterbelohnung enthält
Motorische Fertigkeit	d	Senkung der Nase unterhalb der oberen Zylinderebene
Fressen	x (in Box) c (auf Board)	Fressen der Futterbelohnung in der Box bzw. auf dem Board
Wiederholter Lochbesuch	l	Aktives Aufsuchen eines bereits geleerten, markierten Lochs
Falsches Loch	k	Besuch eines nicht markierten Lochs
Männchen machen	t	Erheben auf die Hinterbeine
Fellpflege	z (in Box) u (auf Board)	Sich Putzen in der Box bzw. auf dem Board
Inaktivität	i (in Box) 6 (auf Board)	Mindestens drei Sekunden langes regungsloses Verharren in der Box bzw. auf dem Board
Linienüberschreitung	e	Zielgerichtetes Übertreten einer Linie mit beiden Vorderpfoten
Urin	n	Urinabsatz
Bolus	b	Absatz eines Kotballens
Beenden einer Phase	j	Beenden einer Aktivitätsphase (Motorische Fertigkeit, Fressen, Fellpflege, Inaktivität)

*(Tastenbelegung nach Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“, Klinikum rechts der Isar, München)*

Die Datenerfassung wird beendet, wenn das Tier die Futterbelohnungen in allen drei markierten Zylindern gefunden und gefressen hat oder wenn die maximale Durchlaufzeit von fünf Minuten erreicht ist.

### **3.2.3.2 Versuchsablauf**

Der Test wird an acht aufeinander folgenden Tagen zur Hauptaktivitätszeit der Mäuse in den ersten Stunden der Dunkelphase durchgeführt. Um die zirkadiane Rhythmik der Tiere nicht zu stören wird auf das Einschalten der weißen Raumbelichtung während der Dunkelphase verzichtet. Da Mäuse den langwelligen (über 580 nm) roten Bereich des Lichtspektrums nicht wahrnehmen können (PEICHL, 1997), wird auf Rotlicht (60 Watt Glühbirne aus rotem Naturglas, Radium Lampenwerk GmbH, Wipperfürth) zurückgegriffen, um für den Untersucher geeignete Arbeitsbedingungen zu schaffen.

Der tägliche Versuchsablauf folgt einem festen Schema. Das Computerprogramm zur Datenerfassung wird gestartet und das Hole-Board vorbereitet, indem sämtliche Löcher unterhalb der Gitterebene mit Hilfe einer Pinzette mit je einem Mandelstück bestückt werden. Die drei, nach dem randomisierten Schema verteilten, markierten Löcher erhalten zusätzlich noch ein für die Tiere erreichbares Mandelstück oberhalb des Gitters. Beim ersten Durchlauf des ersten Versuchstages wird für jedes Tier ein zusätzliches Mandelstückchen in den Bereich gelegt, in den die Maus abgesetzt wird, um den ersten Kontakt mit dem mHB für sie mit einem positiven Erlebnis zu verbinden. Alle Zylinder werden zudem mittels Wattetupfer (Raucotupf<sup>®</sup>, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf) an ihrer Innenseite mit der Vanillearomalösung bestrichen.

Der Untersucher nimmt eine stehende Position vor dem mHB ein, von der aus er die gesamte Versuchsarena gut überblicken kann. Das Versuchstier wird nun mit der linken Hand an der Schwanzbasis aus dem Käfig genommen und im linken vorderen Quadranten der Versuchsarena abgesetzt. Zeitgleich mit dem Loslassen des Tieres wird mit der rechten Hand auf der Computertastatur der Befehl zum Starten der Datenprotokollierung gegeben. Da der Untersucher sich ohne Unterbrechung auf die Tierobservation konzentrieren muss, werden die Tastaturbefehle zeitlich synchron zu den Tieraktionen blind eingetippt. Findet die Maus alle Futterbelohnungen, so endet der Testdurchlauf nach der letzten Futteraufnahme, andernfalls nach maximal fünf Minuten. Jedes Tier absolviert pro Tag vier Durchläufe, wobei die Reihenfolge der zu testenden Tiere in jedem Durchgang und an jedem Versuchstag nach einem randomisierten Schema alterniert. Nach jedem Durchlauf wird die Maus wieder in

ihren Käfig zurückgesetzt und die Versuchsarena von Verschmutzungen wie Einstreureste, Urin oder Kotballen mit einem mit Wasser befeuchteten Zellstofftuch gereinigt.

Im Anschluss können anhand der erhobenen Daten für jede Versuchsgruppe die zu untersuchenden Parameter in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel 2003, Redmond, USA) berechnet werden.

### **3.2.3.3 Untersuchte Parameter**

Bei dem mHBT handelt es sich um eine etablierte Testmethode zur gleichzeitigen Erhebung einer Vielzahl verschiedener Parameter. Es können kognitive Leistungen, verschiedene Verhaltensdimensionen und motorische Fähigkeiten der Versuchstiere ermittelt und verglichen werden (OHL et al., 2001; OHL et al., 2003; GORDAN et al., 2012) (siehe Abbildung 8).

#### Kognitionsparameter

Kognitive Parameter im mHBT geben Aufschluss über die Lernleistung und die Motivation des Versuchstiers. Zudem können die Leistungsfähigkeit des deklarativen Gedächtnisses und des Arbeitsgedächtnisses beurteilt werden. Über die Zuordnung der Gedächtnissysteme zu ihren jeweiligen assoziierten Gehirnbereichen lassen sich im Falle kognitiver Leistungsdefizite Rückschlüsse auf die Lokalisationen der Beeinträchtigungen im Gehirn ziehen.

Im Verlauf des Verhaltenstests soll das Versuchstier lernen, gezielt nur markierte Löcher aufzusuchen, da es nur dort mit Futter belohnt wird. Somit zählt die Gesamtzeit eines Durchlaufs (sog. „Time Trial“) als Indikator für Lernleistung und Motivation. Bei der Anzahl besuchter Löcher ohne Markierungen (sog. „Wrong Choices“) und der Anzahl nicht besuchter, markierter Löcher (sog. „Omission Errors“) innerhalb eines Durchlaufs handelt es sich um zwei kognitive Parameter, die dem deklarativen Gedächtnis zugeordnet werden. Deklarative Gedächtnisprozesse sind notwendig für das bewusste Erinnern an Fakten und Ereignisse und werden als Hippokampus-abhängig betrachtet (SQUIRE und ZOLA, 1996; OHL und FUCHS, 1999; OHL et al., 2003). Omission Errors werden zusätzlich von der Motivation beeinflusst. Wrong Choices und Omission Errors ergeben zusammen die Gesamtfehler eines Durchlaufs (sog. „Wrong Choices Total“). Die Leistung des Arbeitsgedächtnisses und damit des präfrontalen Kortex ergibt sich aus der Anzahl der

wiederholten Besuche markierter, zuvor bereits geleerter Löcher (sog. „Repeated Choices“) (OHL und FUCHS, 1999; BADDELEY, 2003; OHL et al., 2003).

### Verhaltensparameter

Die erhobenen Verhaltensparameter lassen sich verschiedenen Verhaltensdimensionen zuordnen: Erkundungsverhalten, Angstverhalten und Erregung.

Beim Erkundungsverhalten lässt sich zwischen zielgerichteter und ungerichteter Exploration unterscheiden. Zur gerichteten Explorationstätigkeit zählt die Dauer bis das erste Loch aufgesucht wird (sog. „Latency First Hole Visit“) und die Gesamtzahl besuchter Löcher mit Futterbelohnung (sog. „Correct Hole Visits“), während das Aufrichten auf die Hinterbeine (sog. „Rearing“) eine ungerichtete Exploration der Umgebung widerspiegelt.

Da der mHBT auch Eigenschaften eines offenen Feldes aufweist, lassen sich dementsprechend angstassoziierte Verhaltensweisen bestimmen. So kann das Vermeidungsverhalten gegenüber dem ungeschützten Bereich eines offenen Feldes, dargestellt durch das im Zentrum liegende Board, beurteilt werden. Dafür werden die Latenzzeit bis zum ersten Betreten des Boards (sog. „Latency First Board Entry“), die Anzahl der Boardbesuche (sog. „Number of Board Entries“) und die verbrachte Gesamtzeit auf dem Board (sog. „Time on Board“) ausgewertet. Zusätzlich kann die Dauer unbeweglichen Verharrens (sog. „Immobility“) das Angstniveau der Maus widerspiegeln.

Kotabsatz (sog. „Boli“) und die Gesamtzeit der Putzphasen (sog. „Grooming“) werden als Maß für die Erregung des Tieres verstanden.

### Motorische Parameter

Beim Bewegungsverhalten wird zwischen allgemeiner lokomotorischer Aktivität und Feinmotorik unterschieden. Die Anzahl der Überquerungen der aufgeklebten Linien in der Versuchsarena (sog. „Line Crossings“) steht für die allgemeine Bewegungsaktivität. Wenn die Maus ein markiertes, gefülltes Loch zwar besucht, aber die Futterbelohnung nicht herausholt und frisst (sog. „Unsuccessful Hole Visits“), kann dies für feinmotorische Defizite sprechen. Auch gibt die Zeit, die die Maus braucht um ein Mandelstückchen zu fressen (sog. „Time Food Intake“), Auskunft über die feinmotorischen Fähigkeiten.

Kognition	Verhalten	Motorik
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Time Trial</li> <li>•Wrong Choices</li> <li>•Omission Errors</li> <li>•Repeated Choices</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Latency First Hole Visit</li> <li>•Rearing</li> <li>•Correct Hole Visits</li> <li>•Latency First Board Entry</li> <li>•Number of Board Entries</li> <li>•Time on Board</li> <li>•Immobility</li> <li>•Boli</li> <li>•Grooming</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Line Crossings</li> <li>•Unsuccessful Hole Visits</li> <li>•Time Food Intake</li> </ul>

**Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung untersuchbarer Parameter im mHBT (modifiziert nach OHL et al. (2003))**

### 3.2.4 Probenentnahme

Am Tag nach Beendigung des mHBTs werden die Mäuse in einer Plexiglasbox mit 5,0 Vol.-% Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in tiefe Narkose versetzt und durch Dekapitation getötet. Mit Hilfe eines Eppendorfer Reaktionsgefäßes (1,5 ml) (Eppendorf AG, Hamburg) wird Blut aus der Halsregion des Tieres aufgefangen und in einer Standzentrifuge (Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) bei 12000 U/min bei 4 °C für drei Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Serum wird abpipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

Die Bestimmung der Konzentration von Östradiol und Testosteron im gewonnenen Blutserum erfolgt mit Hilfe des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (Elecsys<sup>®</sup>-2010, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durch Frau Huber vom Institut für Klinische Chemie Pathobiochemie (Klinikums rechts der Isar, München).

Zur Präparation des Gehirns wird die Schädelkalotte durch Resektion von Kopfhaut und Muskulatur freigelegt und die Schädelknochen von kaudal nach rostral bis zur Kranznaht durch eine Pinzette abgetragen. Mit Hilfe eines Spatels wird das Gehirn aus der Schädelgrube entnommen und mit der Basis nach unten auf einer auf Trockeneis platzierten Metallplatte tiefgefroren. Das gefrorene Gehirn wird in einem Aluminiumzylinder bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

### **3.2.5 Western-Blot-Verfahren**

Zur semiquantitativen Analyse bestimmter Rezeptoren im Gehirn wird das Western-Blot-Verfahren (TOWBIN et al., 1979; BURNETTE, 1981) als anerkannte und etablierte Methode genutzt. Dazu wird ein Proteingemisch mit Hilfe der Gelelektrophorese entsprechend des Molekulargewichts der einzelnen Proteine aufgetrennt. Die entstandenen Proteinbanden werden auf eine Trägermembran übertragen. Anschließend können die gesuchten Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

#### **3.2.5.1 Proteinextraktion**

Für den folgenden Untersuchungsgang werden von den tiefgefrorenen Mausgehirnen in einem Kryostat-Mikrotom (HM 355, Microm International GmbH, Walldorf) bei -20 °C Schnitte mit einer Schnittdicke von 300 µm angefertigt. Dabei wird der Hippokampus unter adspektorischer Kontrolle mit einem Skalpell isoliert und in ein Eppendorfer Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg) verbracht. Die Präparate werden bei -80 °C gelagert.

Der Vorgang der Proteinextraktion erfolgt unter strikter Einhaltung einer kontinuierlichen Kühlung der Proben, indem sämtliche Schritte über Wassereis durchgeführt werden. Als weitere Maßnahme zur Vorbeugung eines ungewollten Proteinabbaus durch freigesetzte intrazelluläre Enzyme ist der Zusatz von Proteaseinhibitoren nötig.

Zur Proteinextraktion werden die noch gefrorenen Hippokampus-Proben über Wassereis in 1,5 ml großen Eppendorfer Reaktionsgefäßen mit 500 µl frisch angesetzter, auf 4 °C gekühlter Lysepufferlösung versetzt (siehe Tabelle 3). Anschließend werden die Proben manuell mittels 1 ml-Spritzen (Omnifix<sup>®</sup>-F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit Einmal-Injektionskanülen mit absteigendem Durchmesser (20, 22, 24 und 27 Gauge) (Sterican<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) homogenisiert und bei 4 °C mit 3800 U/min für 10 min zentrifugiert (Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode). Der Überstand wird in ein 2 ml großes Eppendorfer Gefäß überführt. Das Pellet, das sich am Grund des Gefäßes abgesetzt hat, wird in 1 ml Puffer resuspendiert und in einem zweiten Zentrifugationsschritt mit 7000 U/min 15 min zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wird zu dem ersten Überstand pipettiert und dann mit Puffer auf insgesamt 2 ml Probenvolumen aufgefüllt. Der letzte Zentrifugationsschritt erfolgt mit 13000 U/min für 30 min. Der Überstand wird verworfen, während das zurückbleibende Pellet mit 102 µl 2 % Sodiumdodecylsulfat-Lösung (SDS) (SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) als Denaturierungsmittel versetzt wird.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Proteaseinhibitoren-haltigen Lysepufferlösung**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller der Ausgangssubstanz</b>	<b>Mengenangabe</b>
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	Tris: Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim HCl: Merck KGaA, Darmstadt	1 ml
Sukrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	5,14 g
100x Tris-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	500 µl
100 mM PMSF	neoLab Migge Laborbedarf Vertriebs GmbH, Heidelberg	100 µl
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	1 Tablette
H <sub>2</sub> O dest.	Laboreigene Herstellung	ad 50 ml

### **3.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die quantitative Proteinbestimmung wird mit dem Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA) durchgeführt, der auf einer modifizierten Methode nach LOWRY (1951) beruht. Der Assay basiert auf der Reaktion von Proteinen mit alkalischer Kupfertartratlösung und Folin-Reagens. Dabei kommt es zur Ausbildung eines Komplexes zwischen den Peptidbindungen der Proteine und den Kupfer-Ionen, was zur Reduktion des Folin-Reagens zu Molybdänblau führt. Die resultierende charakteristische Blaufärbung wird zur photometrischen Bestimmung der in der Probe vorhandenen Proteinmenge genutzt.

Von den Proteinproben werden mit destilliertem Wasser zwei Verdünnungen hergestellt (1:5 und 1:10). In einer Mikrotiterplatte (BRANDplates<sup>®</sup>, BRAND GmbH & Co. KG) werden 5 µl beider Verdünnungsstufen mit 25 µl der alkalischen Lösung A sowieso 200 µl der Lösung B, dem Folin-Reagens, versetzt. Um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wird im Doppelansatz gearbeitet. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wird die Absorption der Proben mit Hilfe eines Photometers (SpectraII, SLT Labinstrument, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt. Durch die vorangegangene Erstellung einer Eichkurve mittels einer definierten Konzentrationsreihe bovines Serumalbumins (Bio-Rad Protein Assay Standard H, Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA) lassen sich die Proteinkonzentrationen anhand der entsprechenden Tabelle mit den Standardwerten ermitteln (siehe Tabelle 4).

**Tabelle 4: Mit bovinem Serumalbumin ermittelter Standard bei 620 nm Wellenlänge**

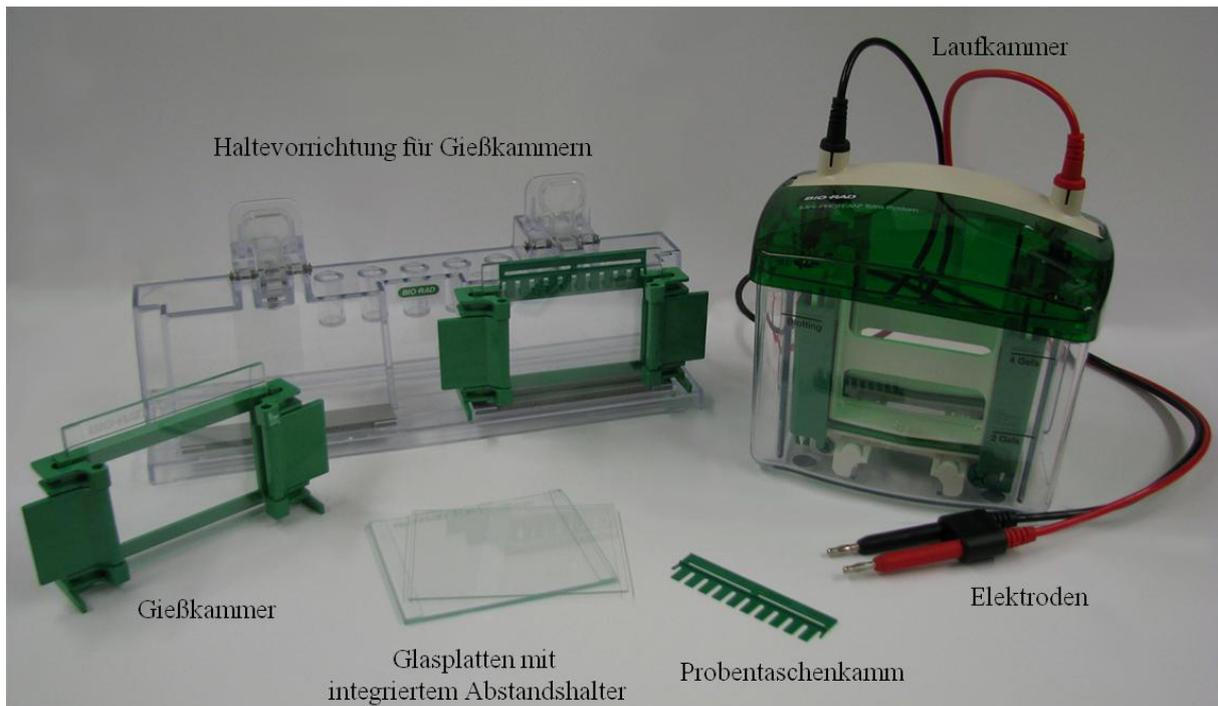
<b>Protein- konzentration [mg/ml]</b>	<b>Absorption [nm]</b>
0	0,04
0,02	0,043
0,05	0,047
0,1	0,056
0,2	0,072
0,5	0,123
1	0,206
2	0,355

Zur abschließenden Vorbereitung der zu analysierenden Proteinlysate-Proben für den nächsten Schritt der Gelelektrophorese werden diese weiter denaturiert und reduziert. Hierfür werden 97,5 µl der Hippokampus-Proben mit 37,5 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) und 15,0 µl NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) versetzt. Das Gemisch wird im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg) bei 70 °C und 300 U/min 10 min inkubiert.

### **3.2.5.3 Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der Proteine wird die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Es handelt sich um ein diskontinuierliches Verfahren, bei dem zwei verschiedene, in der Horizontalen voneinander getrennten Gele verwendet werden, die sich in Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Die Proteine wandern zunächst gemeinsam durch das grobporige Sammelgel (pH 6,8), in dem sie aufkonzentriert werden. Erst im feinporigen Trenngel (pH 8,8) erfolgt die Auftrennung in einzelne Banden. Durch Verwendung des anionischen Detergens SDS werden alle Proteine negativ geladen, so dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld einzig vom Molekulargewicht abhängt.

Für die Gelelektrophorese werden die Kammern und das weitere Zubehör des Mini-PROTEAN® Tetra Cell-Systems von Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) genutzt (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Darstellung des Mini-PROTEAN® Tetra Cell-Systems zur Gelelektrophorese**

Zum Gießen der Gele wird die Gießkammer verwendet, in der zwei Glasplatten der Größen 10,1 cm x 7,3 cm und 10,1 cm x 8,2 cm durch den integrierten Abstandshalter mit einem Abstand von 1,5 mm eingespannt werden. Gummidichtungen verhindern das Auslaufen noch nicht auspolymerisierten Gels. Das Anmischen der Gele erfolgt immer erst direkt vor dem Gießen nach dem in Tabelle 5 dargestellten Pipettierschema.

**Tabelle 5: Pipettierschema für Sammelgel und Trenngele**

Substanz	Hersteller der Ausgangssubstanz	8 % Trenngel	12 % Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O dest.	Laboreigene Herstellung	10,6 ml	8,6 ml	6,3 ml
40 % Acrylamid-Mix (Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4 ml	6 ml	1,25 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	Tris: Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim HCl: Merck KGaA, Darmstadt:	5 ml	5 ml	
1,0 M Tris-HCl (pH 6,8)	Tris: Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim HCl: Merck KGaA, Darmstadt			1,25 ml
10 % SDS	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg	200 ml	200 ml	100 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	200 ml	200 ml	100 ml
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	20 ml	20 ml	10 ml

***Pipettierschema für Sammelgel und Trenngele mit 8% Gel zur NMDAR-NR2B- und mGluR5-Bestimmung und 12% Gel zur PBR-Bestimmung***

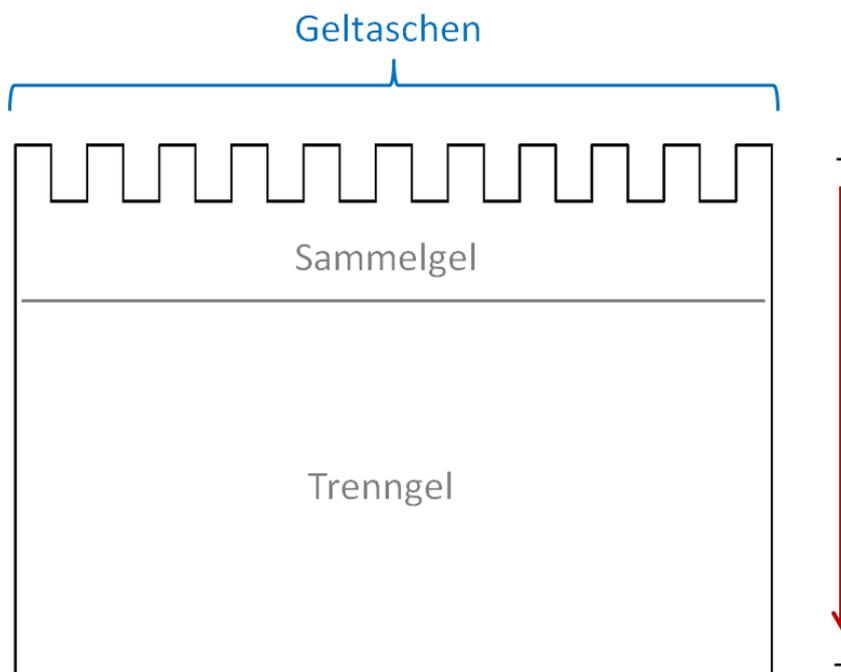
Zunächst wird das Trenngel bis zu einer Höhe von 5 cm zwischen die Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt) luftdicht überschichtet. Nach vollständiger Auspolymerisation nach etwa einer Stunde kann der Alkohol abgegossen und das Sammelgel angemischt und über das Trenngel pipettiert werden. Bevor es zur Polymerisation kommt, wird ein Probentaschenkamm mit zehn Zacken zwischen die Glasplatten gesteckt, so dass an dieser Stelle im Gel zehn Aussparungen entstehen.

Für die Elektrophorese werden die Glasplatten mit den auspolymerisierten Gelen in den Rahmen der Laufkammer eingespannt, vorsichtig der Kamm aus dem Gel entfernt und die innere und äußere Elektrophoresekammer mit 1x SDS-Laufpuffer (siehe Tabelle 6) gefüllt.

**Tabelle 6: Pipettierschema des 1x Laufpuffers**

Substanz	Hersteller der Ausgangssubstanz	Mengenangabe
Tris	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	3,02 g
Glyzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	14,4 g
SDS	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg	1,0 g
H <sub>2</sub> O dest.	Laboreigene Herstellung	ad 1 l

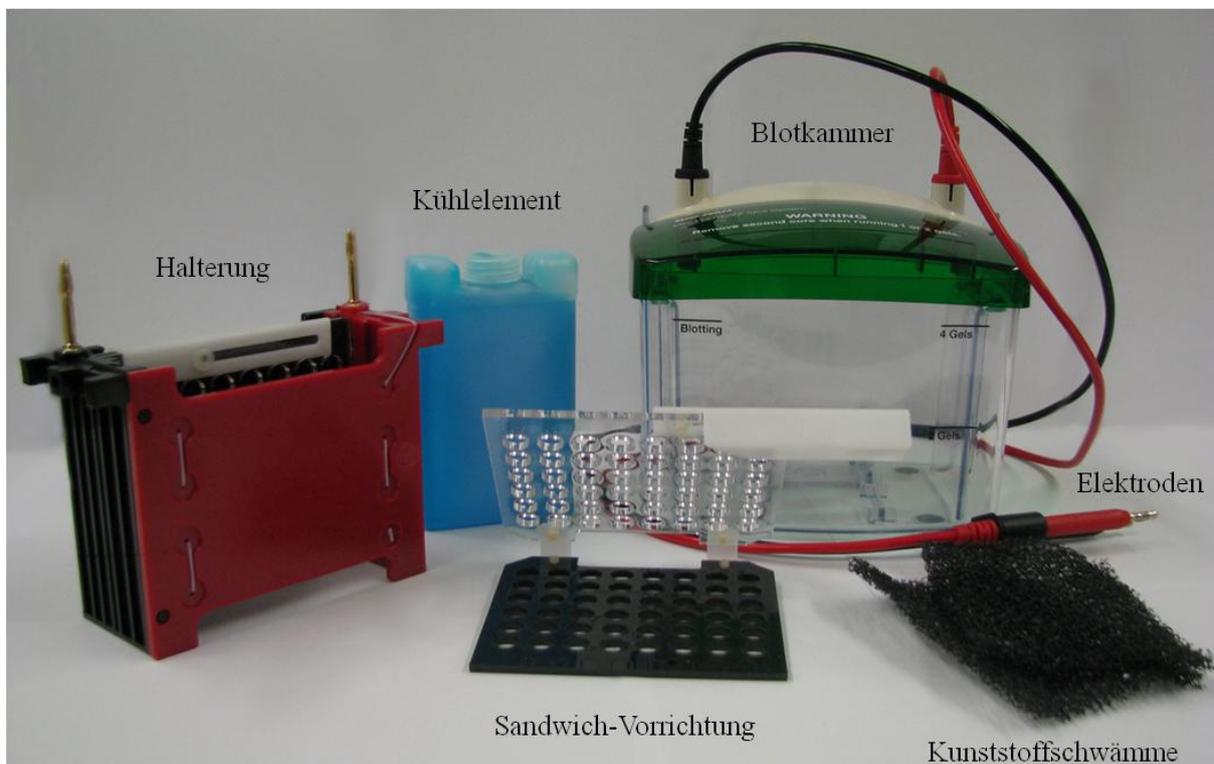
Zur Vergleichbarkeit der Proben wird die Proteinmenge pro Geltasche auf 25 µg festgelegt. Anhand der berechneten Proteinkonzentration der einzelnen Proben wird entsprechend viel Probenmaterial in die entstandenen Taschen im Sammelgel pipettiert. Zur Darstellung der Proteinauftrennung sowie zur späteren Überprüfung der Proteinübertragung wird in eine Geltasche 10 µl eines farbigen Molekulargewichtsmarkers gefüllt (MagicMark™ XP (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) und Novex® (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) im Verhältnis 1:9). Danach wird die Elektrophorese bei 200 Volt über 45 Minuten durchgeführt (siehe Abbildung 10).



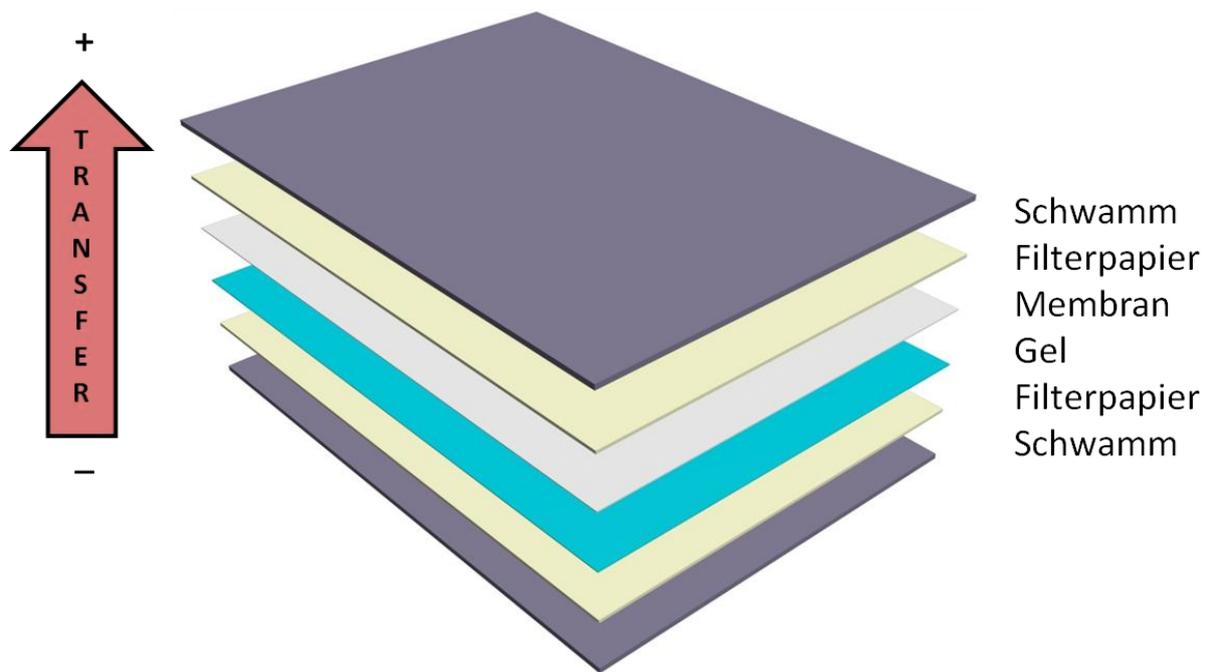
**Abbildung 10: Schematische Darstellung wichtiger Komponenten der Gelelektrophorese: Sammelgel mit Geltaschen und Trenngel sowie Laufrichtung der Proteine**

### 3.2.5.4 Transfer und Darstellung der Proteine

Nach Auftrennung der Proteine erfolgt der eigentliche Western-Blot mit Hilfe des Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell Moduls (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) (siehe Abbildung 11), bei dem die Proteinbanden vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham<sup>™</sup> Hybond<sup>™</sup>-ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) im dazu senkrecht angelegten elektrischen Feld transferiert werden. Dazu werden zwei Kunststoffschwämme, zwei Filterpapiere (Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Accessories, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und die Membran in der Größe des Gels mit Transferpuffer gesättigt und anschließend im sog. „Sandwichverfahren“ mit dem aus der Laufkammer entnommenen Gel analog zu Abbildung 12 übereinander geschichtet. Das Sandwich wird in die Halterung der Blotkammer gespannt, die mit einem Kühlelement ausgestattet und mit Transferpuffer gefüllt wird (siehe Tabelle 7). Der Transfer findet bei 35 Volt über 60 Minuten statt.



**Abbildung 11: Darstellung des Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell Moduls für den Proteintransfer (Blotting)**



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des „Gel-Sandwiches“ beim Western-Blot-Verfahren**

**Tabelle 7: Pipettierschema des 1x Transferpuffers**

Substanz	Hersteller der Ausgangssubstanz	Mengenangabe
Tris	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	6,07 g
Glyzin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	28,83 g
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt	400 ml
H <sub>2</sub> O dest.	Laboreigene Herstellung	ad 2 l

Es folgt eine dreimalige 10-minütige Waschung der Nitrozellulosemembran in 0,1 % Tween20-haltiger (Tween<sup>®</sup>20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) Tris-gepufferter Kochsalzlösung (Tris-Buffered-Saline Tween-20, TBS-T). Diese und sämtliche folgenden Waschschrte werden auf einem Schüttler (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau) bei Raumtemperatur durchgeführt. Um die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran zu sättigen wird sie bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit 5 % Magermilchpulver (Kloster Apotheke, München) 2 h lang geblockt. Es folgen drei

Waschschritte in TBS-T für jeweils 10 min. Zur Detektion der zu untersuchenden Proteine wird ein jeweils spezifischer Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in TBS-T eingesetzt (siehe Tabelle 8). Die Membran wird darin über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert und anschließend werden durch dreimalige 10-minütige Waschung in TBS-T nicht gebundene Antikörper entfernt. Danach wird die Membran mit einem mit Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 6) für 2 h inkubiert. Im Anschluss werden analog zu den vorherigen Waschschritten die überschüssigen Antikörper gründlich entfernt.

***Tabelle 8: Übersicht über die Rezeptorproteine mit ihren jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern in den gewählten Verdünnungsstufen***

<b>Rezeptorprotein</b>	<b>mGluR5</b>	<b>NMDAR-NR2B</b>	<b>PBR</b>
Primärantikörper	Rabbit Anti-mGluR5 (monoklonal)	Rabbit Anti-NMDAR-NR2B (polyklonal)	Rabbit Anti-PBR (monoklonal)
Molekulargewicht	133 kDa	180 kDa	19 kDa
Hersteller	Novus Europe, Cambridge, Großbritannien	Invitrogen AG, Carlsbad, USA	Abcam plc, Cambridge, Großbritannien
Verdünnung	1:5000 (TBS-T)	1:1000 (TBS-T)	1:10000 (TBS-T)
Sekundärantikörper	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)	Donkey ECL Anti-rabbit IgG (HRP konjugiert)
Hersteller	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
Verdünnung	1:10000 (TBS-T)	1:5000 (TBS-T)	1:5000 (TBS-T)

Zur Darstellung der Proteinbanden wird die Membran zunächst abgetropft und dann in einer Schüssel für 2 min mit 3 ml ( $0,125 \text{ ml/cm}^2$ ) einer zuvor angemischten Detektionslösung (Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1) (Amersham<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>-Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) bedeckt, wodurch eine Chemilumineszenz-Reaktion des enthaltenen Luminols durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert wird. Die Membran wird luftblasenfrei auf der Kodak Image Station 440 CF (Kodak GmbH, Stuttgart) aufgelegt, für 15 min belichtet und das erhaltene Bild abgespeichert. Die Schwärzungsintensität der gesuchten Proteinbanden wird mit Hilfe der Software Kodak 1D Version 3.5 (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) bestimmt.

### 3.2.6 Statistische Bewertung der Befunde

Die statistische Auswertung des Körpergewichts und der im modifizierten Hole-Board-Test erhobenen Parameter erfolgt im Rahmen des allgemeinen linearen Modells durch Varianzanalyse mit Messwiederholung auf dem Faktor „Zeit“. In die Datenauswertung geht das arithmetische Mittel über die Werte der vier Durchläufe pro Untersuchungstag ein. Die Analyse wird mit den Zwischensubjektfaktoren „Alter“, „Geschlecht“ und „Genotyp“ durchgeführt. Die Serumhormon-Konzentrationen werden mit Hilfe des Kruskal-Wallis- und des Mann-Whitney-Tests ausgewertet. Die statistische Beurteilung von Tierverlusten und auftretendem Penisprolaps wird mit dem Qui-Quadrat-Vierfeldertest nach Pearson durchgeführt. Die Analyse der Western-Blot-Daten erfolgt durch die univariate Varianzanalyse mit den Faktoren „Alter“ und „Geschlecht“.

Das Signifikanzniveau wird auf 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) festgelegt. Bei post hoc durchgeführten Einzelvergleichen wird zur Vermeidung einer  $\alpha$ -Fehler-Kumulierung bei multiplem Testen eine Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni vorgenommen. Dabei werden die Überschreitungswahrscheinlichkeiten (p-Werte) als signifikant (sig.) oder nicht signifikant (n.s.) auf dem jeweils adjustierten  $\alpha$ -Niveau angegeben.

Die Berechnung der statistischen Ergebnisse erfolgt mit dem Computerprogramm IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics Version 20.0.0.1 (IBM Corporation, Armonk, USA).

### 3.3 Ergebnisse

Für die Studie sind insgesamt 144 Tiere randomisiert in 24 Gruppen ( $n = 6$  pro Gruppe) mit dem modifizierten Hole-Board-Test hinsichtlich Kognition, Verhalten und Bewegungsverhalten untersucht worden.

#### 3.3.1 Mortalität

Bei der Auswertung der Zuchtergebnisse zeigt sich, dass von 203 geborenen männlichen Mäusen, die für die Studie genotypisiert worden sind, 95 Tiere Träger des Transgens (Carrier) sind. Unter den 158 weiblichen genotypisierten Mäusen sind 77 Tiere Carrier. Das entspricht einem Carrier-Anteil von 46,8 % bei den Männchen und 48,7 % bei den Weibchen. Nicht zu der Zählung hinzugefügt wurden 9 männliche und 6 weibliche Mäuse unbekanntem Genotyps, die noch vor der Genotypisierung verstorben sind.

Die Anzahl der Tiere, die in die Auswertung der postnatalen Mortalität eingeht, setzt sich aus der Zahl der für die Studie benötigten Tiere und der zusätzlich eingeplanten Tiere als Ersatz für Abgänge zusammen. Konkret erfolgt die Untersuchung auf Sterblichkeit im Zeitraum vom Verbringen der Mäuse in den speziellen Tierhaltungsraum bis zu dem Tag, an dem sie den modifizierten Hole-Board-Test (mHBT) abschließen.

48,4 % der männlichen Carrier und 25,4 % der weiblichen Carrier versterben, bevor die Tiere das geplante Versuchsalter erreichen ( $p = 0,005$ ). Dagegen ist im Vergleich zu den entsprechenden Carriern die Mortalität männlicher Wildtypen mit 7,3 % ( $p < 0,001$ ) und weiblicher Wildtypen mit 4,6 % ( $p = 0,001$ ) signifikant niedriger. Bei den Wildtypen zeigt sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Mortalität ( $p = 0,558$ ) (siehe Tabelle 9).

**Tabelle 9: Überleben und Sterblichkeit männlicher und weiblicher Carrier und Wildtypen**

Gruppe	männliche C		weibliche C		männliche WT		weibliche WT	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
eingelante Tiere	91	100	59	100	41	100	65	100
überlebt	47	51,6	44	74,6	38	92,7	62	95,4
verstorben	44	48,4	15	25,4	3	7,3	3	4,6
Grund für Abgang	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
plötzlicher Tod	39	88,6	15	100	2	66,6	1	33,3
Euthanasie (Penisprolaps)	5	11,4	0	0	1	33,3	0	0
Euthanasie (Verletzung)	0	0	0	0	0	0	1	33,3
Euthanasie (Tumorverdacht)	0	0	0	0	0	0	1	33,3

**Überleben und Sterblichkeit männlicher und weiblicher Carrier (C) und Wildtypen (WT) im Zeitraum von der Ankunft der Mäuse im Tierhaltungsraum bis zum geplanten Einsatz im mHBT sowie Ursachen für deren Abgang, angegeben in absoluten Werten und in Prozent (%) der eingelanten Tiere bzw. in Prozent (%) der Ausfälle**

Bei 25,3 % aller männlichen Carrier gegenüber 2,4 % aller männlichen Wildtypen tritt mindestens einmal im Untersuchungszeitraum ein Penisprolaps auf ( $p = 0,002$ ). Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass das betroffene Tier seinen Penis nicht mehr selbstständig in die Vorhaut zurückziehen kann. Gelingt es durch manuelles und therapeutisches Eingreifen mit Salbe (5 % Dexpanthenol-haltige Salbe, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München) nicht, den Penis zurückzuverlagern, wird das Tier euthanasiert (siehe Tabelle 9). Tritt im Verlauf ein weiterer Penisprolaps auf, erfolgt ebenfalls die Euthanasie. Von den 23 männlichen Carriern mit einmal im Untersuchungszeitraum erlittenem Penisvorfall versterben insgesamt 12 Tiere (52,2 %), davon fünf durch Euthanasie und sieben versterben im weiteren Verlauf aufgrund unbekannter Ursache. Im Vergleich weisen Carrier, die im Untersuchungszeitraum keinen Penisprolaps erleiden, eine Mortalität von 47,1 % auf ( $p = 0,671$ ).

50,0 % der Verluste aller männlichen Carrier und 60,0 % aller weiblichen Carrier treten innerhalb des ersten Monats nach dem Verbringen aus dem Zuchtraum in den Tierhaltungsraum auf. Der Transport erfolgt in unterschiedlichem Lebensalter der Tiere. Nach Abzug der Todesfälle des ersten Monats im Tierhaltungsraum versterben männliche Carrier zu 95,7 % und weibliche Carrier zu 85,7 % in den ersten 12 Lebensmonaten.

### 3.3.2 Physiologische Parameter

Neben der Genotypisierung der Tiere auf das humane Transgen (siehe Kapitel 3.3.1) erfolgt auch eine Genotypisierung auf einen vererbaren Gendefekt als Auslöser einer Retinadegeneration (rd1-Mutation des Gens der  $\beta$ -Untereinheit der Stäbchen-Phosphodiesterase 6, Pde6b<sup>rd1</sup>). Die Studie schließt vier Carrier ein, die als homozygote Träger (rd1<sup>+</sup>) dieses Gendefekts identifiziert werden: 6 Monate/weiblich/Carrier ( $n_{rd1+} = 1$ ), 8 Monate/weiblich/Carrier ( $n_{rd1+} = 2$ ), 10 Monate/männlich/Carrier ( $n_{rd1+} = 1$ ).

#### 3.3.2.1 Körpergewicht

An allen acht Untersuchungstagen des Verhaltenstests werden die Mäuse der entsprechenden Versuchsgruppe gewogen. In nachfolgender Tabelle sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen ( $\pm$  SD) des Körpergewichts der einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Untersuchungstagen angegeben. Anschließend werden in graphischer Form die Mittelwerte (MW) und Standardfehler ( $\pm$  SEM) im Zeitverlauf dargestellt.

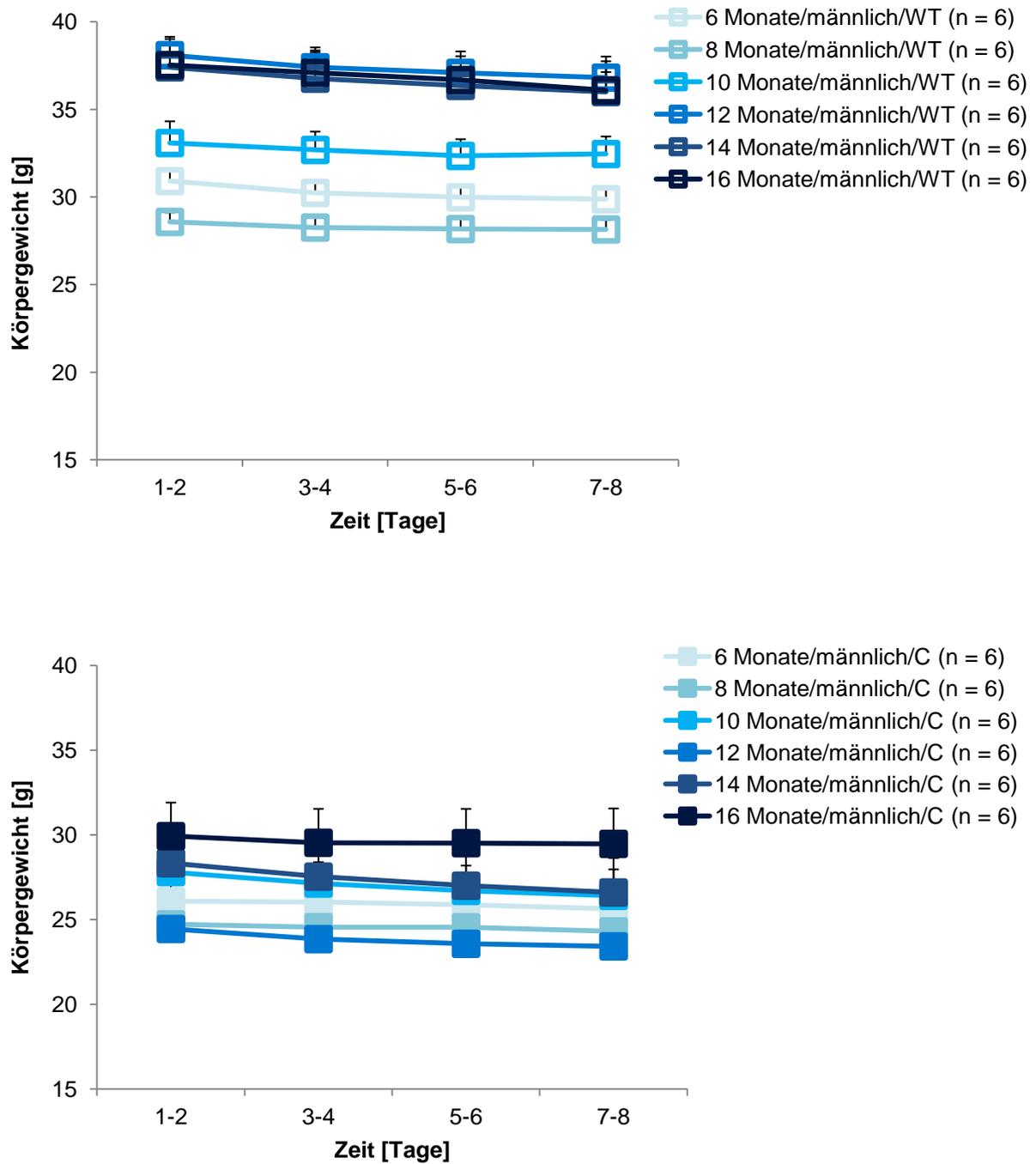
**Tabelle 10: Körpergewicht aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	30,9 ± 1,8	30,2 ± 1,5	30,0 ± 1,6	29,9 ± 1,6
6 Monate/männlich/C	26,1 ± 5,4	26,0 ± 5,8	25,9 ± 5,7	25,6 ± 5,7
6 Monate/weiblich/WT	24,2 ± 0,7	23,5 ± 0,7	22,8 ± 1,1	22,2 ± 1,3
6 Monate/weiblich/C	20,8 ± 1,8	20,3 ± 1,8	20,4 ± 1,9	20,4 ± 2,0
8 Monate/männlich/WT	28,6 ± 1,3	28,3 ± 1,5	28,2 ± 1,5	28,2 ± 1,3
8 Monate/männlich/C	24,7 ± 2,2	24,6 ± 2,1	24,5 ± 2,0	24,3 ± 1,9
8 Monate/weiblich/WT	27,9 ± 2,0	27,1 ± 2,0	27,3 ± 2,1	27,5 ± 2,0
8 Monate/weiblich/C	20,9 ± 2,3	20,3 ± 2,1	19,9 ± 2,0	19,6 ± 1,9
10 Monate/männlich/WT	33,1 ± 3,0	32,7 ± 2,6	32,4 ± 2,3	32,5 ± 2,4
10 Monate/männlich/C	27,8 ± 1,7	27,1 ± 1,5	26,7 ± 1,3	26,4 ± 1,2
10 Monate/weiblich/WT	26,6 ± 2,3	26,4 ± 2,3	26,7 ± 2,1	26,6 ± 2,5
10 Monate/weiblich/C	17,7 ± 2,1	17,4 ± 2,0	17,1 ± 1,9	16,9 ± 1,9
12 Monate/männlich/WT	38,1 ± 2,6	37,4 ± 2,4	37,1 ± 2,3	36,8 ± 2,3
12 Monate/männlich/C	24,4 ± 2,4	23,8 ± 2,4	23,6 ± 2,4	23,4 ± 2,4
12 Monate/weiblich/WT	29,1 ± 2,0	28,0 ± 1,4	27,7 ± 1,2	27,6 ± 1,1
12 Monate/weiblich/C	21,4 ± 3,4	21,0 ± 3,3	20,8 ± 3,3	20,4 ± 3,1
14 Monate/männlich/WT	37,4 ± 5,3	36,8 ± 5,2	36,4 ± 5,0	36,0 ± 4,6
14 Monate/männlich/C	28,3 ± 3,9	27,5 ± 4,4	27,0 ± 4,8	26,6 ± 5,0
14 Monate/weiblich/WT	29,4 ± 3,8	29,3 ± 3,5	29,0 ± 3,2	28,9 ± 3,2
14 Monate/weiblich/C	21,3 ± 3,4	21,1 ± 3,5	21,0 ± 3,4	20,9 ± 3,3
16 Monate/männlich/WT	37,5 ± 3,1	37,1 ± 2,9	36,7 ± 2,6	36,1 ± 2,6
16 Monate/männlich/C	29,9 ± 4,8	29,5 ± 4,9	29,5 ± 5,0	29,5 ± 5,1
16 Monate/weiblich/WT	35,3 ± 6,0	34,8 ± 6,2	34,3 ± 6,2	34,0 ± 6,0
16 Monate/weiblich/C	25,1 ± 3,2	24,5 ± 3,1	24,0 ± 3,1	23,6 ± 3,2

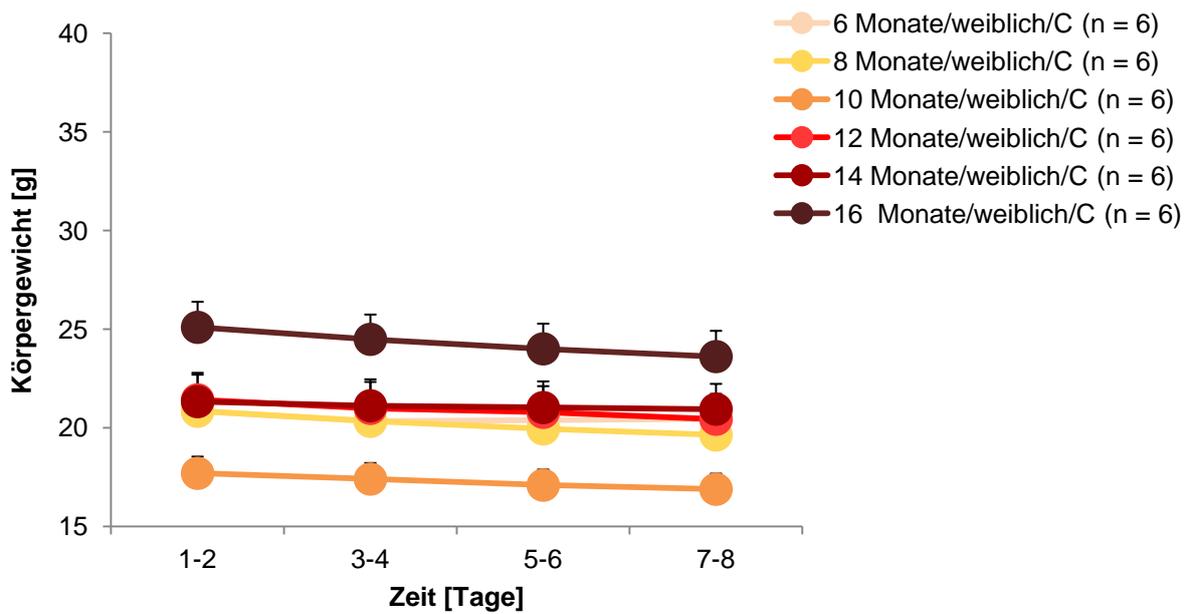
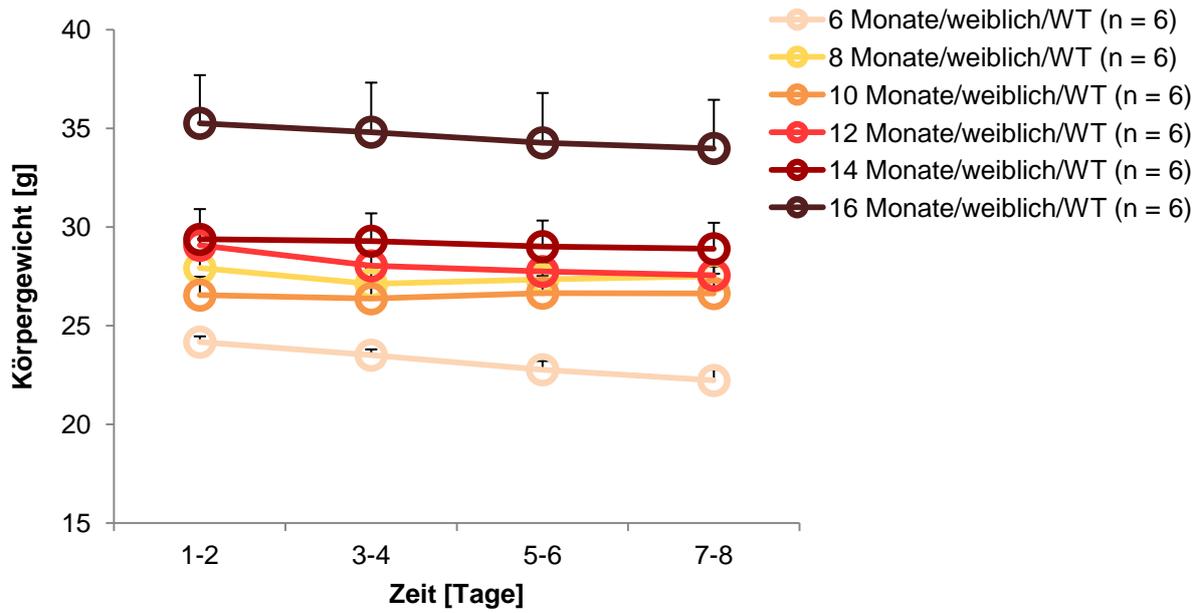
**Körpergewicht in Gramm (g) aller 24 Gruppen (je n = 6) an den festgelegten Untersuchungstagen des mHBTs, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Alle 24 Gruppen verlieren über die Versuchstage des modifizierten Hole-Board-Tests hinweg an Gewicht (Zeit:  $p < 0,001$ ). Dabei wird der zeitliche Verlauf der Gewichtsentwicklung von Wechselwirkungen mit Alter, Genotyp und Geschlecht beeinflusst (Zeit x Alter x Genotyp:  $p = 0,020$ ) (Zeit x Alter x Geschlecht:  $p = 0,022$ ). Unabhängig von Alter und Genotyp wiegen weibliche Tiere generell weniger als männliche Tiere (Geschlecht:  $p < 0,001$ ). Zudem ist das Gewicht der Carrier-Gruppen beider Geschlechter in sämtlichen Altersstufen geringer als das der entsprechenden Wildtyp-Gruppen (Genotyp:  $p < 0,001$ ). Ab einem Alter von 12 Monaten wiegen Wildtypen signifikant mehr als jüngere Tiere (12 Monate vs. 6, 8 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (14 Monate vs. 6, 8 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (16 Monate vs. 6, 8, 10 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)). Dagegen ist bei den Carriern erst mit 16 Monaten eine deutliche Gewichtszunahme zu verzeichnen (16 Monate vs. 6 Monate:  $p = 0,009$  (n.s.); 16 Monate vs.

8, 10, 12 Monate:  $p \leq 0,002$  (sig.)). Diese Interaktion des Genotyps mit den Altersstufen ist signifikant (Alter x Genotyp:  $p = 0,012$ ) (siehe Tabelle 10, Abbildung 13 und 14).



**Abbildung 13: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) des Körpergewichts in Gramm (g) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) in mHBT**



**Abbildung 14:** Vergleichende graphische Darstellung (MW  $\pm$  SEM) des Körpergewichts in Gramm (g) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT

### 3.3.2.2 Geschlechtshormone

Mit Hilfe des Elektrochemilumineszenz-Immunoassays erfolgt eine quantitative Bestimmung spezifischer Geschlechtshormon-Konzentrationen im Blutserum der getöteten Tiere nach Beendigung des Verhaltenstests.

Aufgrund zu geringer Serummengen sind die Östradiol-Bestimmung bei 9 von 144 Tieren und die Testosteron-Bestimmung bei 29 von 144 Tieren nicht möglich. Die untere Nachweisgrenze des Immunoassays liegt bei 5 pg/ml zur Östradiol-Bestimmung und bei 0,03 ng/ml zur Testosteron-Bestimmung. Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze werden durch 4 pg/ml Östradiol bzw. 0,02 ng/ml Testosteron als Arbeitswerte substituiert. Tabellarisch werden die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen ( $MW \pm SD$ ) bzw. graphisch die Mittelwerte und Standardfehler ( $MW \pm SEM$ ) der Geschlechtshormon-Konzentrationen im Blutserum der untersuchten Gruppen angegeben.

**Tabelle 11: Östradiol- und Testosteron-Konzentration im Blutserum aller 24 Gruppen zum Todeszeitpunkt**

Gruppe	N <sub>Östradiol</sub>	n <sub>Testosteron</sub>	Östradiol [pg/ml]	Testosteron [ng/ml]
6 Monate/männlich/WT	6	6	4,95† ± 0,12	0,51 ± 1,07
6 Monate/männlich/C	5	5	4,90† ± 0,00	4,18 ± 6,58
6 Monate/weiblich/WT	4	1	4,90† ± 0,00	0,02† ± 0,00
6 Monate/weiblich/C	6	4	5,55 ± 1,59	0,03 ± 0,01
8 Monate/männlich/WT	6	6	6,80 ± 4,65	1,41 ± 2,66
8 Monate/männlich/C	6	5	4,90† ± 0,00	4,42 ± 6,52
8 Monate/weiblich/WT	6	6	10,85 ± 7,58	0,02† ± 0,00
8 Monate/weiblich/C	6	4	7,17 ± 5,55	0,02† ± 0,00
10 Monate/männlich/WT	6	4	4,90† ± 0,00	0,22 ± 0,16
10 Monate/männlich/C	6	5	4,97† ± 0,16	4,14 ± 4,58
10 Monate/weiblich/WT	6	5	5,30 ± 0,98	0,02† ± 0,00
10 Monate/weiblich/C	4	2	4,90† ± 0,00	0,02† ± 0,01
12 Monate/männlich/WT	6	6	4,90† ± 0,00	4,19 ± 6,18
12 Monate/männlich/C	6	6	5,07 ± 0,32	2,73 ± 6,06
12 Monate/weiblich/WT	6	6	11,17 ± 8,85	0,02† ± 0,00
12 Monate/weiblich/C	5	4	6,72 ± 2,12	0,02† ± 0,00
14 Monate/männlich/WT	6	6	6,72 ± 4,45	3,56 ± 5,84
14 Monate/männlich/C	5	5	10,42 ± 7,64	3,83 ± 6,51
14 Monate/weiblich/WT	6	6	10,97 ± 8,07	0,02† ± 0,01
14 Monate/weiblich/C	5	4	7,40 ± 3,59	0,02† ± 0,00
16 Monate/männlich/WT	6	6	4,90† ± 0,00	2,50 ± 3,45
16 Monate/männlich/C	6	5	4,90† ± 0,00	6,66 ± 6,56
16 Monate/weiblich/WT	6	3	6,33 ± 2,38	0,02† ± 0,00
16 Monate/weiblich/C	5	5	5,78 ± 1,97	0,02† ± 0,00

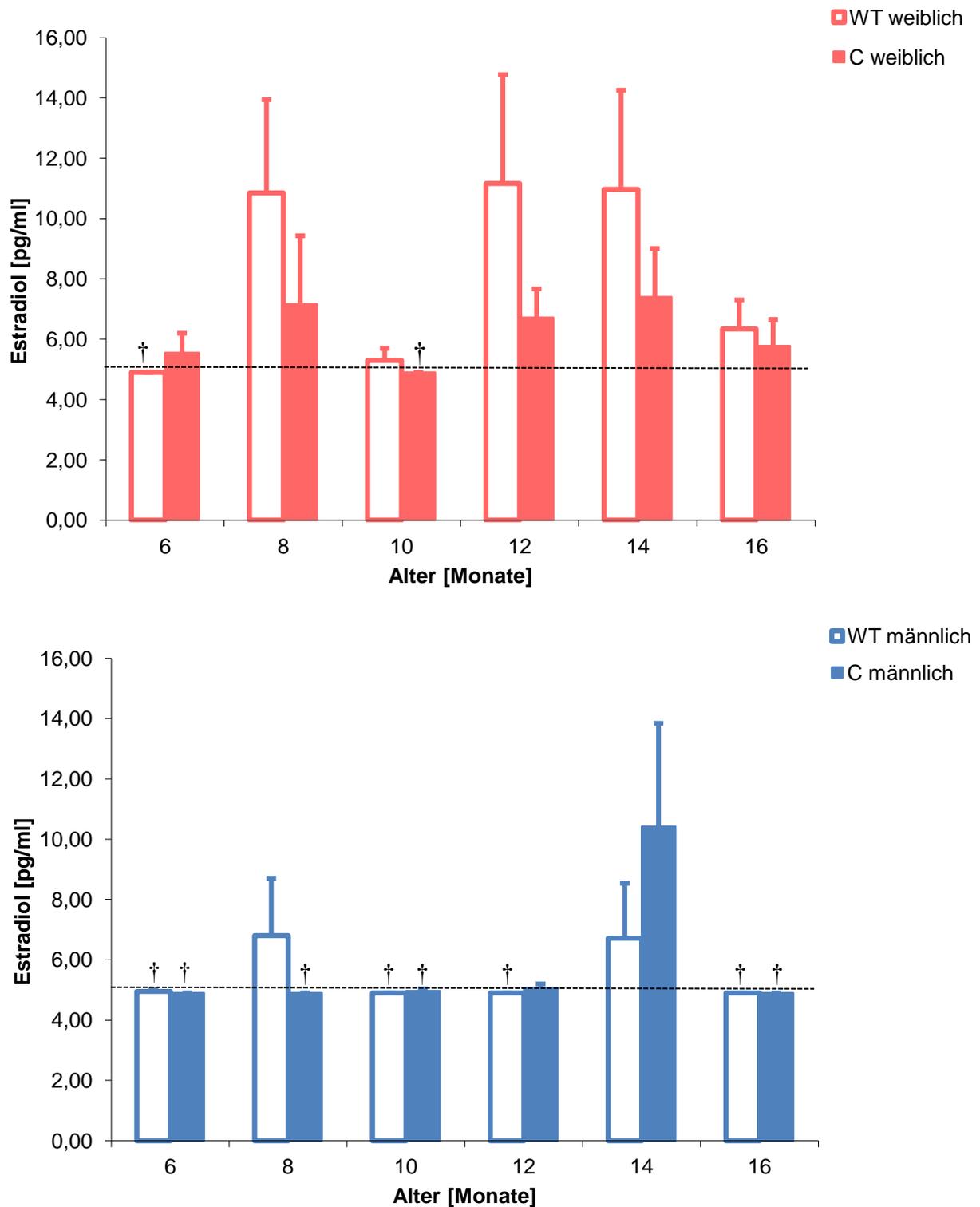
**Östradiol- und Testosteron-Konzentration im Blutserum von n Tieren (n<sub>Östradiol</sub> und n<sub>Testosteron</sub>) aller 24 Gruppen zum Todeszeitpunkt, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

† = Werte unterhalb der Nachweisgrenze (Östradiol: < 5 pg/ml, Testosteron: < 0,03 ng/ml)

Die ermittelten Östradiol-Konzentrationen unterscheiden sich signifikant zwischen den Gruppen ( $p = 0,004$ ). Bei Vergleich der männlichen Tiere untereinander ( $p > 0,05$ ) und der weiblichen Tiere untereinander ( $p > 0,05$ ) sind keine Unterschiede feststellbar. Dagegen ist die Östradiol-Konzentration bei den weiblichen Tieren insgesamt signifikant höher als bei den männlichen Tieren ( $p < 0,001$ ) (siehe Tabelle 11 und Abbildung 15).

Auch bei den Testosteron-Konzentrationen bestehen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,001$ ). Untereinander unterscheiden sich die männlichen Tiere ( $p > 0,05$ ) und die weiblichen Tiere ( $p > 0,05$ ) nicht. Dabei weisen die männlichen Tiere signifikant höhere Testosteron-Werte auf als die weiblichen Tiere ( $p < 0,001$ ), deren Werte überwiegend unter

der Nachweisgrenze von 0,03 ng/ml liegen (siehe Tabelle 11, auf eine Abbildung wird wegen den niedrigen Werten weiblicher Tiere verzichtet).



**Abbildung 15: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Östradiol-Konzentration im Blutserum zum Todeszeitpunkt der weiblichen und männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C)**

† = Werte unterhalb der Nachweisgrenze (gestrichelte Linie) ( $< 5 \text{ pg/ml}$ )

### **3.3.3 Modifizierter Hole-Board-Test**

Die im modifizierten Hole-Board-Test (mHBT) ermittelten Werte der männlichen und weiblichen Carrier (C) und Wildtypen (WT) der unterschiedlichen Altersgruppen werden verschiedenen Parametern der Kognition, des Verhaltens und des Bewegungsverhaltens zugeordnet. In Tabellen werden je Parameter die aus den vier Durchläufen pro Untersuchungstag und Tiergruppe berechneten arithmetischen Mittelwerte (MW) und deren Standardabweichungen ( $\pm$  SD) angegeben. Exemplarisch werden einige relevante, später diskutierte Ergebnisse in graphischer Form unter Angabe der Mittelwerte und Standardfehler ( $\pm$  SEM) hervorgehoben.

#### **3.3.3.1 Kognitionsparameter**

Im Rahmen der kognitiven Parameter werden tabellarisch die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen (MW  $\pm$  SD) bzw. graphisch die Mittelwerte und Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) der Anzahl falsch besuchter Löcher (sog. „Wrong Choices“), wiederholt besuchter Löcher (sog. „Repeated Choices“), ausgelassener Löcher (sog. „Omission Errors“) und die pro Durchlauf benötigte Gesamtzeit (sog. „Time Trial“) aufgezeigt.

## Wrong Choices

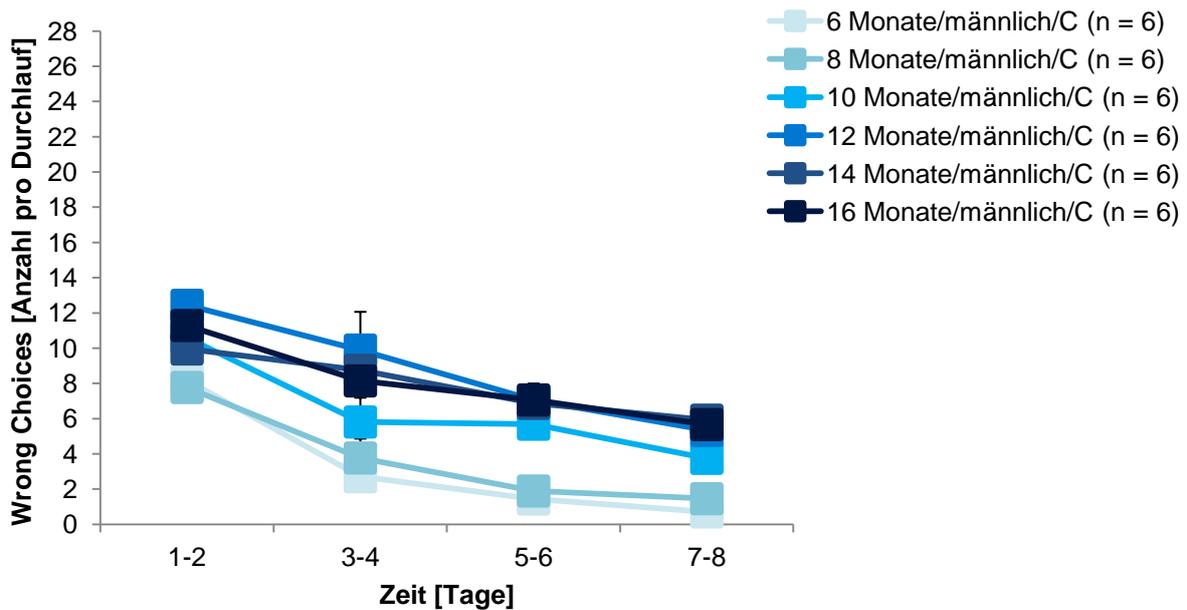
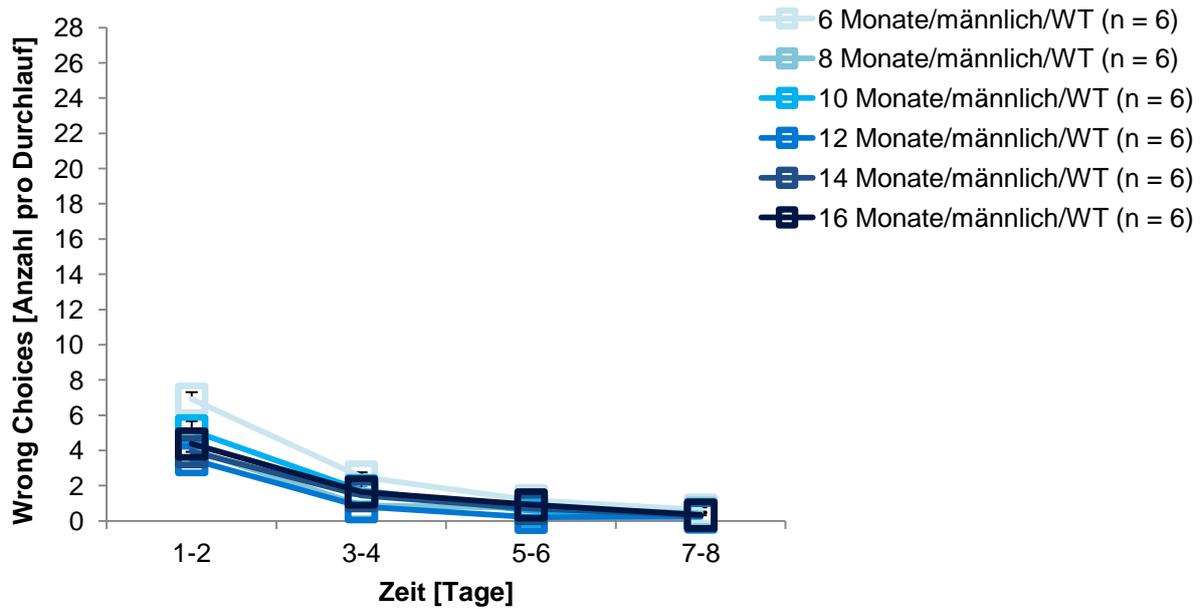
**Tabelle 12: Anzahl falsch besuchter Löcher aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	6,9 ± 1,0	2,5 ± 0,6	1,2 ± 0,5	0,6 ± 0,4
6 Monate/männlich/C	8,2 ± 1,6	2,7 ± 1,3	1,4 ± 0,6	0,7 ± 0,6
6 Monate/weiblich/WT	4,2 ± 1,3	1,3 ± 0,8	0,6 ± 0,6	0,6 ± 0,3
6 Monate/weiblich/C	2,8 ± 2,0	1,8 ± 1,6	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,5
8 Monate/männlich/WT	4,0 ± 1,9	0,8 ± 0,4	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,2
8 Monate/männlich/C	7,8 ± 1,3	3,8 ± 2,7	1,9 ± 1,1	1,5 ± 0,5
8 Monate/weiblich/WT	3,6 ± 2,3	2,3 ± 1,3	1,5 ± 0,6	0,9 ± 0,7
8 Monate/weiblich/C	8,1 ± 4,5	2,4 ± 2,3	1,5 ± 0,8	0,6 ± 0,2
10 Monate/männlich/WT	5,1 ± 1,3	1,7 ± 0,9	0,6 ± 0,3	0,3 ± 0,4
10 Monate/männlich/C	10,6 ± 4,6	5,8 ± 3,4	5,7 ± 1,8	3,8 ± 1,6
10 Monate/weiblich/WT	4,8 ± 1,4	1,5 ± 0,8	0,9 ± 0,6	0,4 ± 0,2
10 Monate/weiblich/C	12,7 ± 5,8	8,7 ± 2,4	7,0 ± 4,8	3,6 ± 1,9
12 Monate/männlich/WT	3,4 ± 1,2	0,8 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,2
12 Monate/männlich/C	12,4 ± 1,6	9,9 ± 5,3	7,1 ± 1,5	5,3 ± 1,5
12 Monate/weiblich/WT	4,2 ± 1,3	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,2
12 Monate/weiblich/C	23,1 ± 10,9	15,3 ± 5,8	10,5 ± 1,6	6,4 ± 1,5
14 Monate/männlich/WT	3,9 ± 0,7	1,4 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,3 ± 0,2
14 Monate/männlich/C	10,0 ± 2,3	8,8 ± 1,1	6,9 ± 1,3	5,9 ± 1,2
14 Monate/weiblich/WT	3,6 ± 1,0	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2
14 Monate/weiblich/C	13,9 ± 2,9	9,9 ± 1,6	8,9 ± 2,6	9,4 ± 2,4
16 Monate/männlich/WT	4,4 ± 0,4	1,6 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,3 ± 0,3
16 Monate/männlich/C	11,3 ± 2,7	8,1 ± 2,0	7,1 ± 2,3	5,7 ± 1,7
16 Monate/weiblich/WT	4,1 ± 1,0	1,7 ± 0,5	0,9 ± 0,2	0,5 ± 0,1
16 Monate/weiblich/C	16,6 ± 5,7	12,0 ± 4,1	8,3 ± 1,9	6,8 ± 2,0

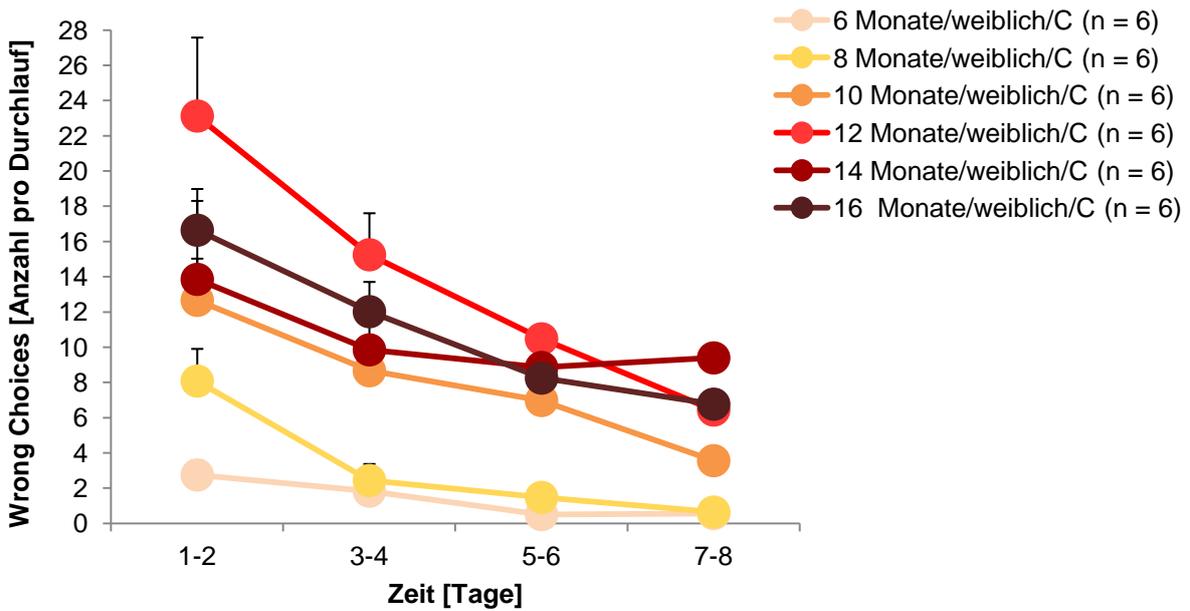
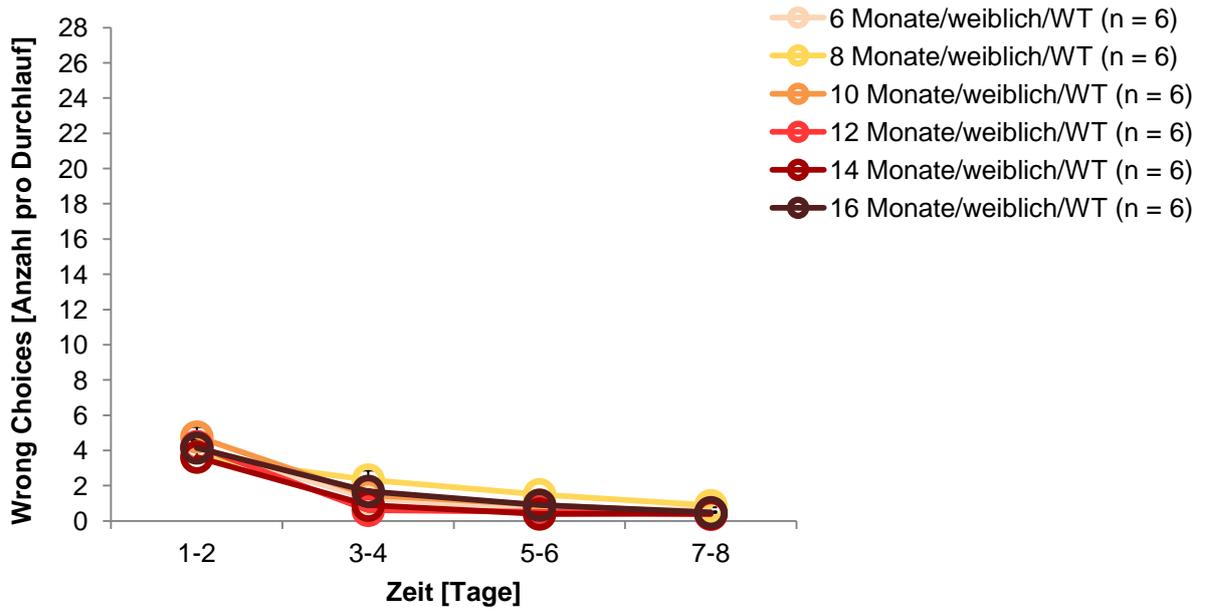
**Anzahl falsch besuchter Löcher pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Über den Untersuchungszeitraum von acht Tagen nimmt die Anzahl falsch besuchter Löcher in allen Gruppen ab (Zeit:  $p < 0,001$ ). Die Fehlerzahl der Wildtypen weist weder zwischen den Geschlechtern noch zwischen den verschiedenen Altersstufen signifikante Unterschiede auf (jeweils  $p > 0,05$ ). Dabei machen die Wildtypen insgesamt weniger Fehler als die Carrier (Genotyp:  $p < 0,001$ ). Dieser Haupteffekt wird durch die Interaktion mit dem Alter modifiziert (Alter x Genotyp:  $p < 0,001$ ): Die Unterschiede zwischen den Genotypen treten tendenziell erstmals im Alter von 8 Monaten in Erscheinung ( $p = 0,017$  (n.s.)) und sind ab 10 Monaten signifikant (jeweils  $p < 0,008$  (sig.)). Im Gegensatz zu den Wildtypen erhöht sich bei den Carriern die Fehlerzahl mit steigendem Alter (10 Monate vs. 6, 8 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (12 Monate vs. 6, 8, 10 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (14 Monate vs. 6, 8 Monate:  $p <$

0,002 (sig.)) (16 Monate vs. 6, 8, 10 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)). Im Alter von 12 bis 16 Monaten verändert sich die Fehlerzahl der Carrier nicht mehr wesentlich (jeweils  $p > 0,002$  (n.s.)). Bei den weiblichen Tieren können stärker ausgeprägte Unterschiede zwischen den verschiedenen Altersstufen festgestellt werden als bei den männlichen Tieren (Alter x Geschlecht:  $p = 0,001$ ). Dabei besuchen weibliche Carrier insgesamt mehr falsche Löcher als männliche Carrier (Geschlecht x Genotyp:  $p = 0,003$ ). Dieser Effekt tritt ab dem Alter von 12 Monaten in Erscheinung (12 Monate:  $p < 0,004$  (sig.)) (14 Monate:  $p = 0,008$  (n.s.)) (16 Monate:  $p < 0,004$  (sig.)) (Alter x Geschlecht x Genotyp:  $p = 0,016$ ) (siehe Tabelle 12 und Abbildung 16 und 17).



**Abbildung 16: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Anzahl falsch besuchter Löcher (Wrong Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**



**Abbildung 17: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Anzahl falsch besuchter Löcher (Wrong Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**

## Repeated Choices

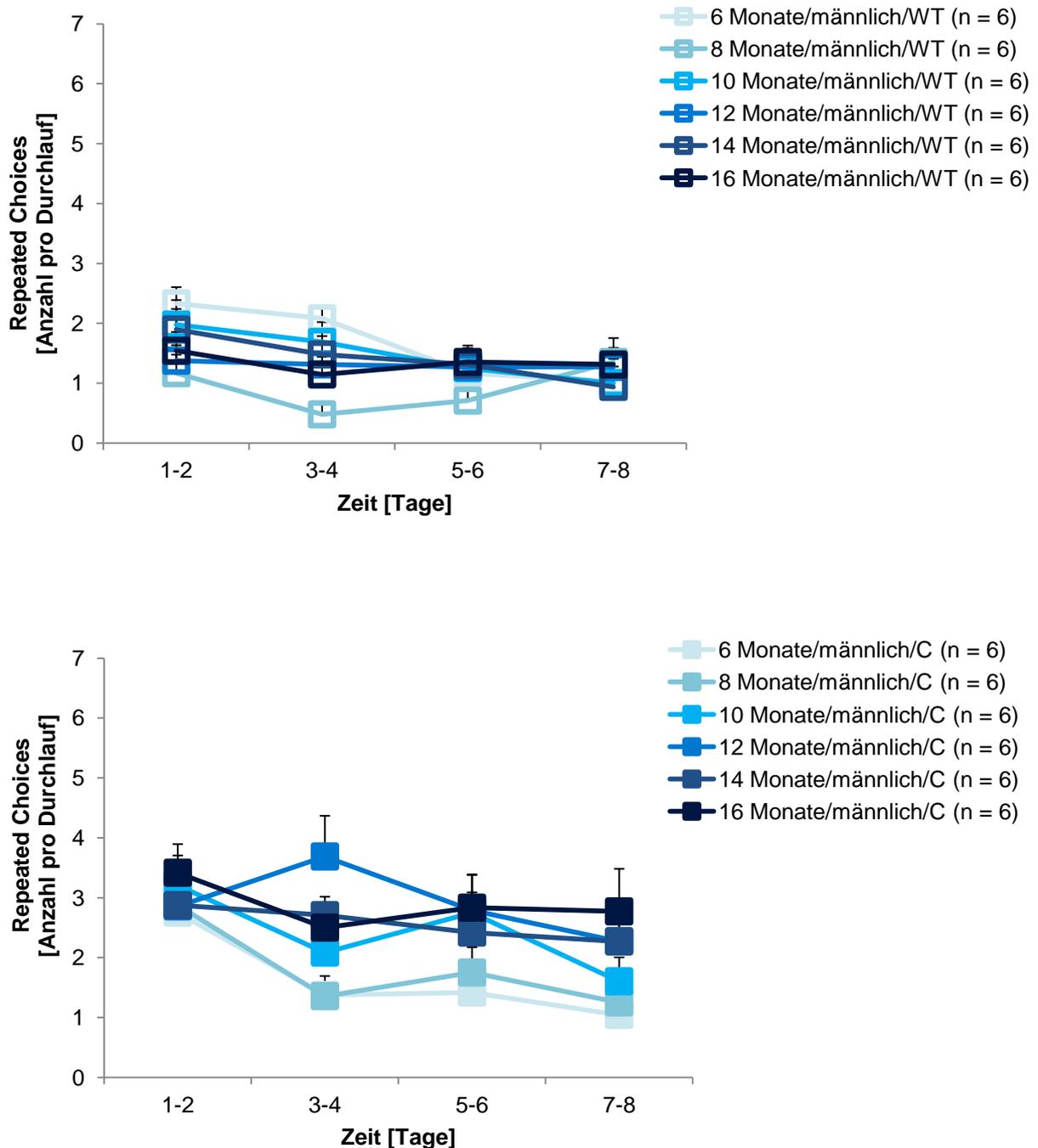
**Tabelle 13: Anzahl wiederholt besuchter Löcher aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	2,3 ± 0,7	2,1 ± 0,5	1,2 ± 0,8	1,0 ± 0,5
6 Monate/männlich/C	2,8 ± 1,4	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,0 ± 0,6
6 Monate/weiblich/WT	1,3 ± 0,9	0,9 ± 0,8	1,0 ± 0,9	1,5 ± 0,6
6 Monate/weiblich/C	1,2 ± 0,9	1,0 ± 0,9	1,1 ± 1,0	0,8 ± 0,7
8 Monate/männlich/WT	1,2 ± 0,8	0,5 ± 0,5	0,7 ± 0,4	1,4 ± 1,0
8 Monate/männlich/C	2,9 ± 1,2	1,4 ± 0,8	1,8 ± 1,0	1,3 ± 0,3
8 Monate/weiblich/WT	0,9 ± 0,8	1,5 ± 1,1	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,4
8 Monate/weiblich/C	2,6 ± 1,9	1,8 ± 1,6	2,7 ± 1,5	2,4 ± 0,9
10 Monate/männlich/WT	2,0 ± 0,6	1,7 ± 0,8	1,3 ± 0,8	1,0 ± 0,4
10 Monate/männlich/C	3,2 ± 1,7	2,1 ± 1,1	2,8 ± 1,6	1,6 ± 1,0
10 Monate/weiblich/WT	2,0 ± 0,4	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,4	0,7 ± 0,2
10 Monate/weiblich/C	3,2 ± 1,6	2,4 ± 0,8	3,1 ± 1,9	2,0 ± 0,7
12 Monate/männlich/WT	1,4 ± 0,6	1,3 ± 0,5	1,3 ± 0,9	1,3 ± 0,3
12 Monate/männlich/C	2,9 ± 1,3	3,7 ± 1,7	2,8 ± 0,7	2,3 ± 0,7
12 Monate/weiblich/WT	1,6 ± 0,6	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,5	0,6 ± 0,4
12 Monate/weiblich/C	5,3 ± 1,8	4,1 ± 1,9	4,9 ± 3,0	4,2 ± 2,0
14 Monate/männlich/WT	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,3	0,9 ± 0,3
14 Monate/männlich/C	2,9 ± 1,2	2,7 ± 0,8	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,8
14 Monate/weiblich/WT	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,4	1,6 ± 0,9	1,0 ± 0,2
14 Monate/weiblich/C	3,6 ± 1,4	2,8 ± 1,2	3,6 ± 1,3	4,3 ± 1,9
16 Monate/männlich/WT	1,5 ± 0,8	1,1 ± 0,7	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,7
16 Monate/männlich/C	3,4 ± 0,7	2,5 ± 0,9	2,8 ± 1,3	2,8 ± 1,7
16 Monate/weiblich/WT	2,0 ± 0,9	1,0 ± 0,5	1,6 ± 0,5	1,5 ± 0,4
16 Monate/weiblich/C	6,0 ± 1,7	3,9 ± 2,1	3,0 ± 1,3	3,0 ± 1,4

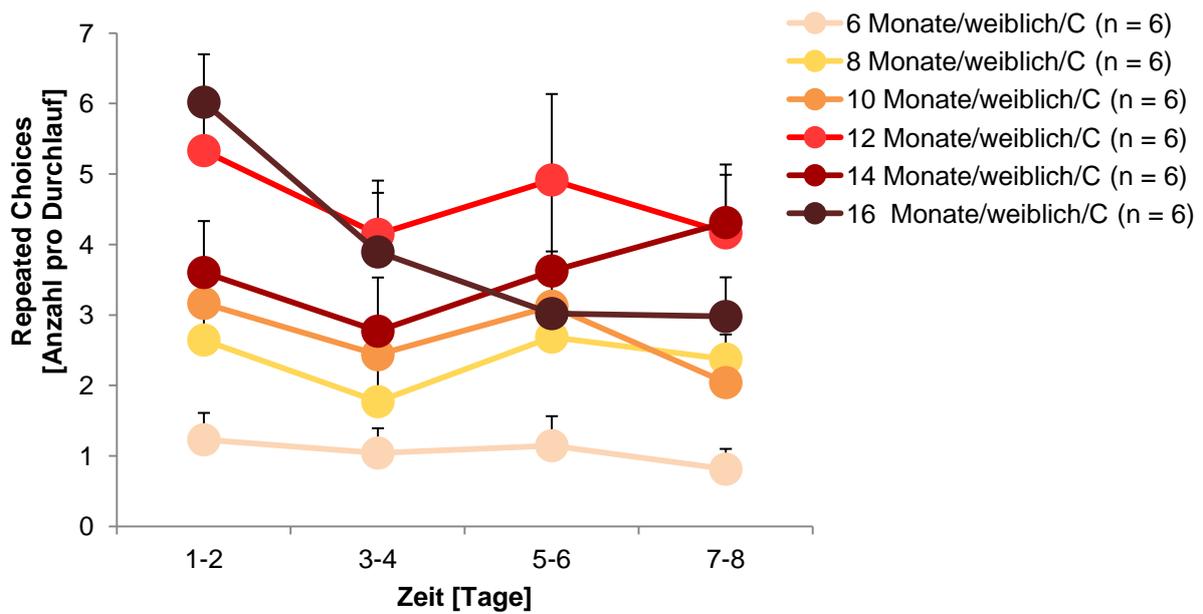
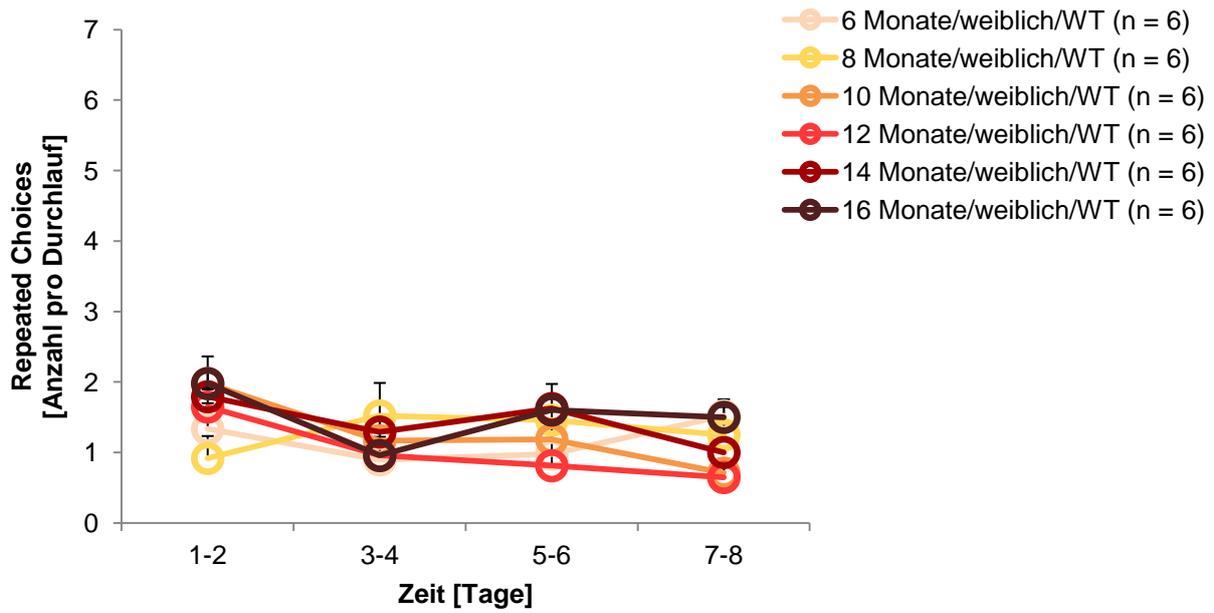
**Anzahl wiederholt besuchter Löcher pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Der zeitliche Verlauf der wiederholten Lochbesuche über die Versuchstage zeigt sich bei den verschiedenen Versuchsgruppen als unregelmäßig schwankend (Zeit:  $p < 0,001$ ). Bei den Wildtypen ergeben sich weder alters- noch geschlechtsbezogene signifikante Unterschiede in der Gesamtzahl wiederholter Lochbesuche (jeweils  $p > 0,05$ ). Die Anzahl der Wiederholungsfehler ist bei den Carriern maßgeblich höher als bei den Wildtypen (Genotyp:  $p < 0,001$ ). Dieser Unterschied zwischen den Genotypen liegt ab einem Alter von 8 Monaten vor (jeweils  $p < 0,008$  (sig.)) (Alter x Genotyp:  $p < 0,001$ ). Dabei nehmen die Wiederholungsfehler der Carrier mit steigendem Alter zu (10 Monate vs. 6 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (12 Monate vs. 6, 8, 10 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (14 Monate vs. 6 Monate:  $p < 0,002$  (sig.); 14 Monate vs. 8 Monate:  $p = 0,004$  (n.s.)) (16 Monate vs. 6, 8 Monate:  $p < 0,002$  (sig.))

(sig.)). Im Alter von 12 bis 16 Monaten sind keine signifikanten Unterschiede untereinander feststellbar (jeweils  $p > 0,002$  (n.s.)). Im Gegensatz zu den Wildtypen liegen bei den Carriern deutliche geschlechtsabhängige Differenzen vor (Geschlecht x Genotyp:  $p = 0,007$ ). So machen weibliche Carrier insgesamt mehr Wiederholungsfehler als männliche Carrier ( $p = 0,001$  (sig.)) (siehe Tabelle 13 und Abbildung 18 und 19).



**Abbildung 18: Vergleichende graphische Darstellung (MW  $\pm$  SEM) der Anzahl wiederholt besuchter Löcher (Repeated Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**



**Abbildung 19: Vergleichende graphische Darstellung (MW  $\pm$  SEM) der Anzahl wiederholt besuchter Löcher (Repeated Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**

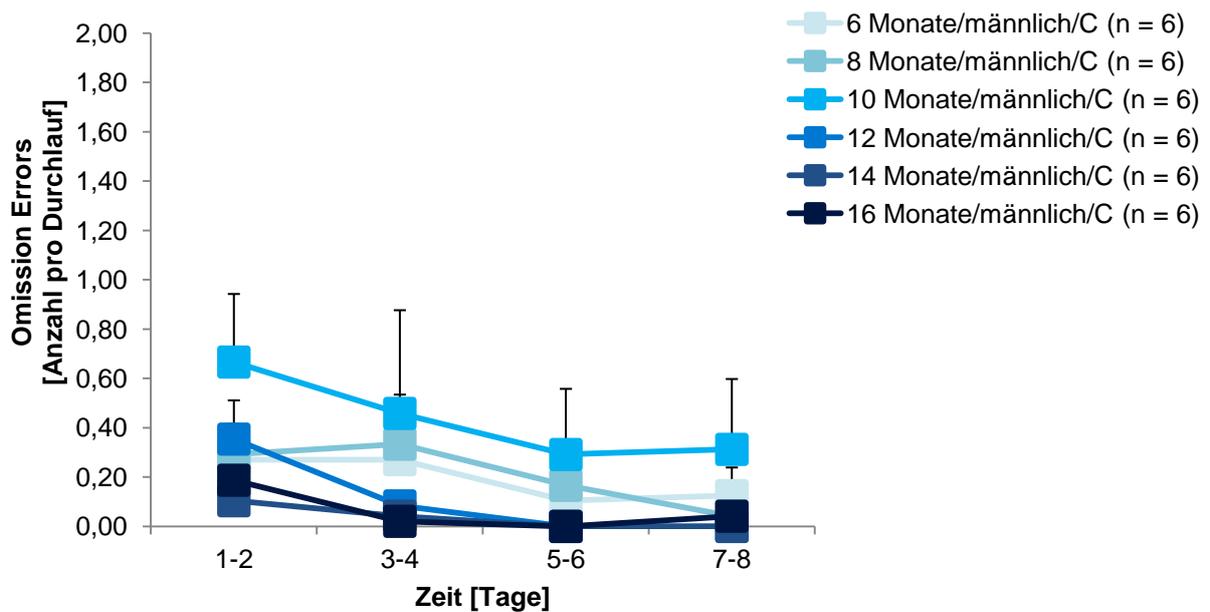
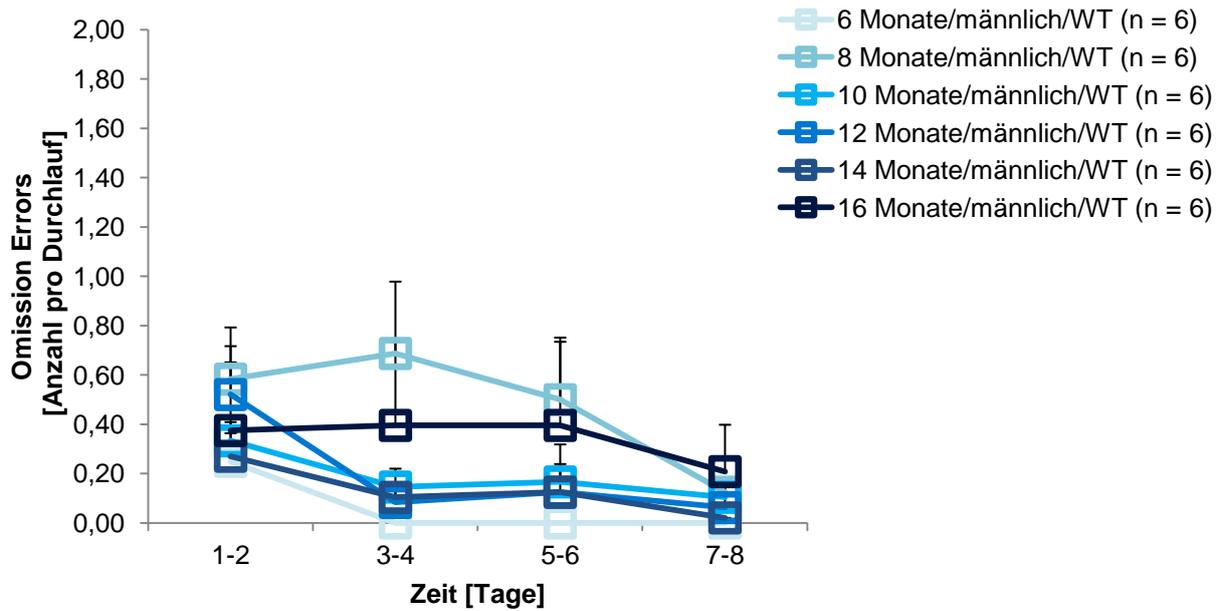
## Omission Errors

**Tabelle 14: Anzahl ausgelassener Löcher aller 24 Gruppen im mHBT**

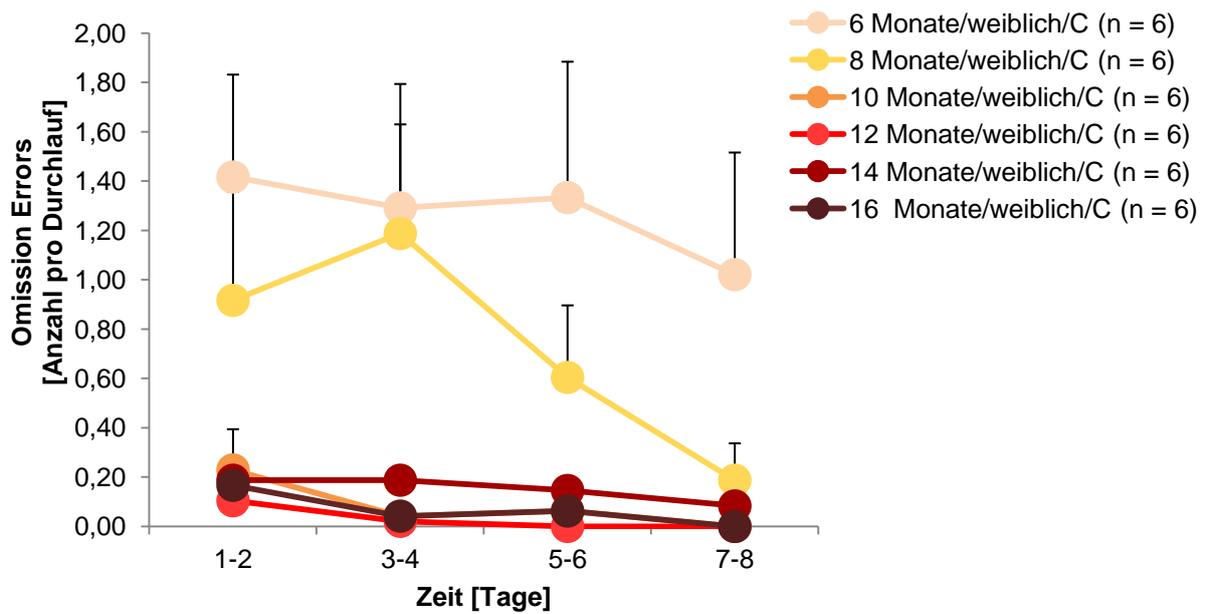
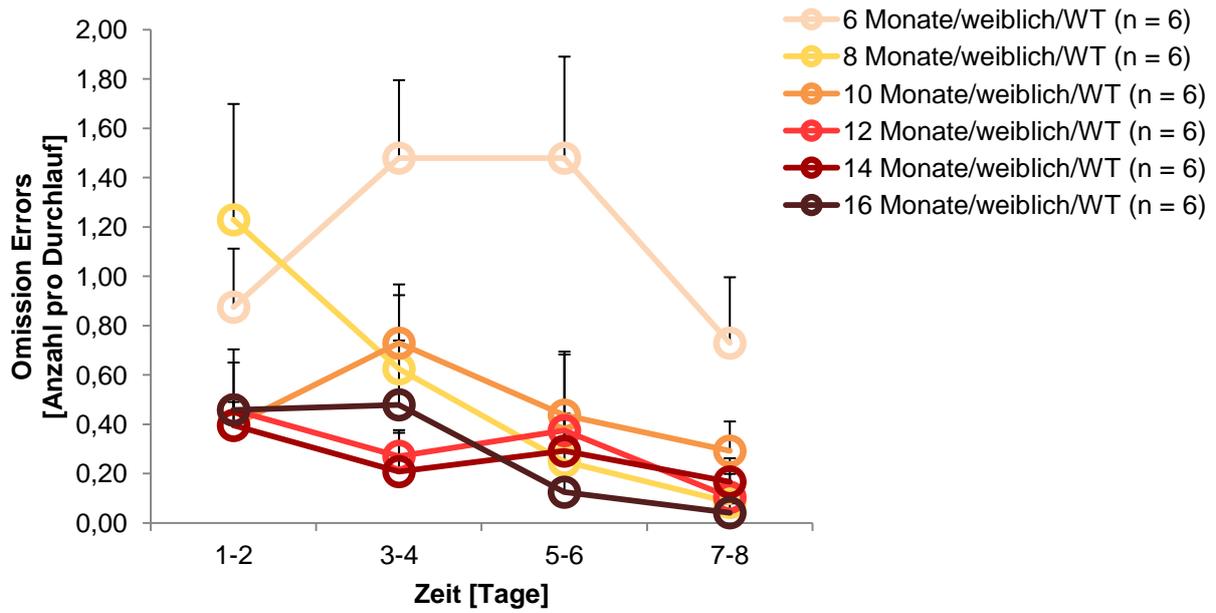
Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	0,25 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
6 Monate/männlich/C	0,27 ± 0,34	0,27 ± 0,61	0,10 ± 0,23	0,13 ± 0,28
6 Monate/weiblich/WT	0,88 ± 0,58	1,48 ± 0,78	1,48 ± 1,01	0,73 ± 0,66
6 Monate/weiblich/C	1,42 ± 1,02	1,29 ± 1,23	1,33 ± 1,35	1,02 ± 1,21
8 Monate/männlich/WT	0,58 ± 0,51	0,69 ± 0,71	0,50 ± 0,62	0,13 ± 0,14
8 Monate/männlich/C	0,29 ± 0,30	0,33 ± 0,49	0,17 ± 0,37	0,04 ± 0,09
8 Monate/weiblich/WT	1,23 ± 1,15	0,63 ± 0,73	0,25 ± 0,41	0,08 ± 0,14
8 Monate/weiblich/C	0,92 ± 1,08	1,19 ± 1,08	0,60 ± 0,72	0,19 ± 0,37
10 Monate/männlich/WT	0,33 ± 0,19	0,15 ± 0,18	0,17 ± 0,37	0,10 ± 0,18
10 Monate/männlich/C	0,67 ± 0,68	0,46 ± 1,02	0,29 ± 0,65	0,31 ± 0,70
10 Monate/weiblich/WT	0,40 ± 0,23	0,73 ± 0,58	0,44 ± 0,60	0,29 ± 0,29
10 Monate/weiblich/C	0,23 ± 0,40	0,04 ± 0,09	0,06 ± 0,14	0,00 ± 0,00
12 Monate/männlich/WT	0,52 ± 0,48	0,08 ± 0,14	0,13 ± 0,28	0,06 ± 0,14
12 Monate/männlich/C	0,35 ± 0,38	0,08 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
12 Monate/weiblich/WT	0,46 ± 0,47	0,27 ± 0,23	0,38 ± 0,78	0,10 ± 0,23
12 Monate/weiblich/C	0,10 ± 0,11	0,02 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14 Monate/männlich/WT	0,27 ± 0,29	0,10 ± 0,13	0,13 ± 0,13	0,02 ± 0,05
14 Monate/männlich/C	0,10 ± 0,11	0,04 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14 Monate/weiblich/WT	0,40 ± 0,30	0,21 ± 0,41	0,29 ± 0,21	0,17 ± 0,14
14 Monate/weiblich/C	0,19 ± 0,21	0,19 ± 0,42	0,15 ± 0,21	0,08 ± 0,14
16 Monate/männlich/WT	0,38 ± 0,68	0,40 ± 0,83	0,40 ± 0,83	0,21 ± 0,47
16 Monate/männlich/C	0,19 ± 0,14	0,02 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,06
16 Monate/weiblich/WT	0,46 ± 0,60	0,48 ± 0,64	0,13 ± 0,13	0,04 ± 0,09
16 Monate/weiblich/C	0,17 ± 0,14	0,04 ± 0,06	0,06 ± 0,10	0,00 ± 0,00

**Anzahl ausgelassener Löcher pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

In allen Gruppen reduziert sich die Anzahl ausgelassener Löcher über den Versuchszeitraum hinweg (Zeit:  $p < 0,001$ ). Wildtypen und Carrier verhalten sich hierin gleich (Genotyp:  $p > 0,05$ ). Die 6 Monate alten weiblichen Tiere machen signifikant mehr Auslassungsfehler im Vergleich zu den 10 bis 16 Monate alten weiblichen Tieren (jeweils  $p < 0,002$  (sig.)). Ebenso machen die 6 Monate alten weiblichen Tiere signifikant mehr Fehler als die 6 Monate alten männlichen Tieren ( $p < 0,008$  (sig.)) (Alter x Geschlecht:  $p = 0,001$ ) (siehe Tabelle 14 und Abbildung 20 und 21).



**Abbildung 20: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Anzahl ausgelassener Löcher (Omission Errors) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**



**Abbildung 21: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Anzahl ausgelassener Löcher (Omission Errors) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**

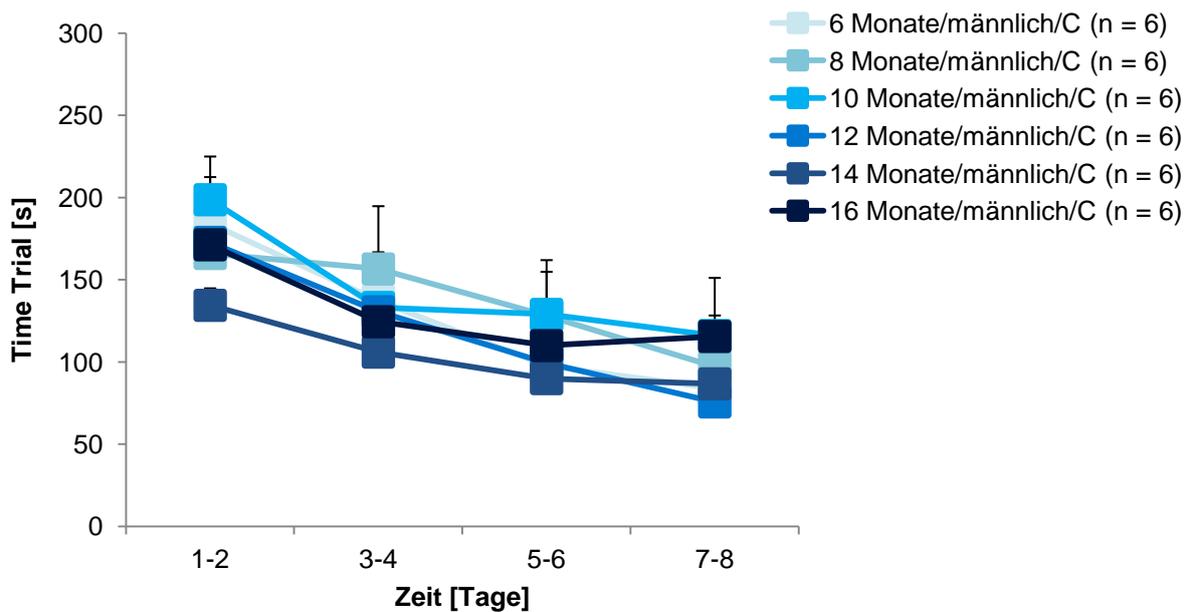
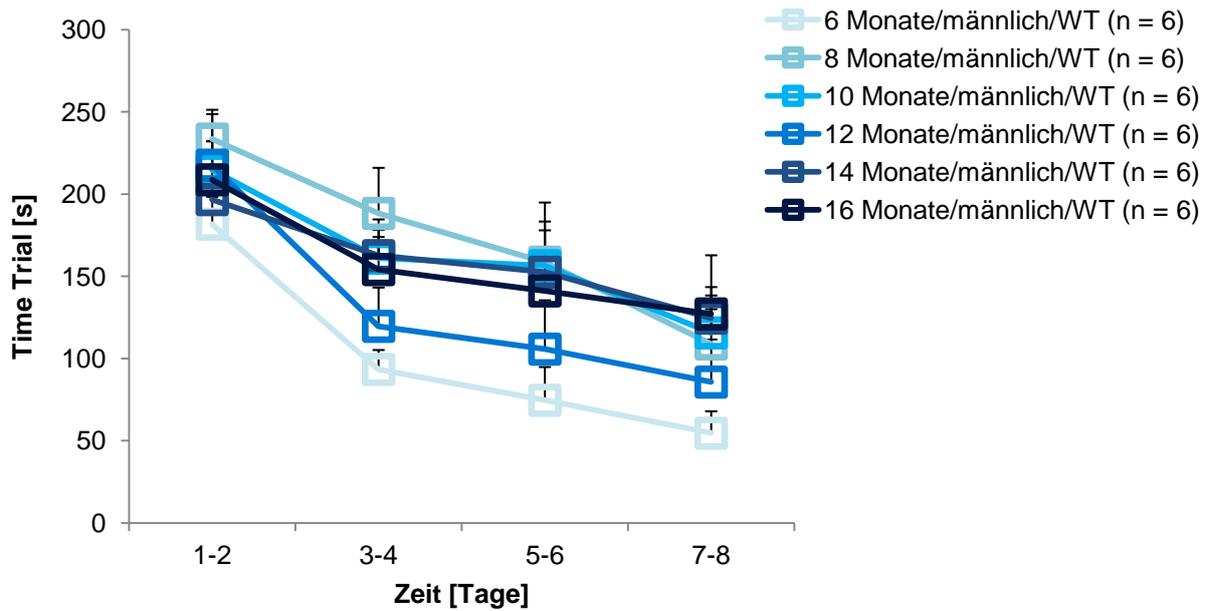
## Time Trial

**Tabelle 15: Benötigte Gesamtzeit aller 24 Gruppen im mHBT**

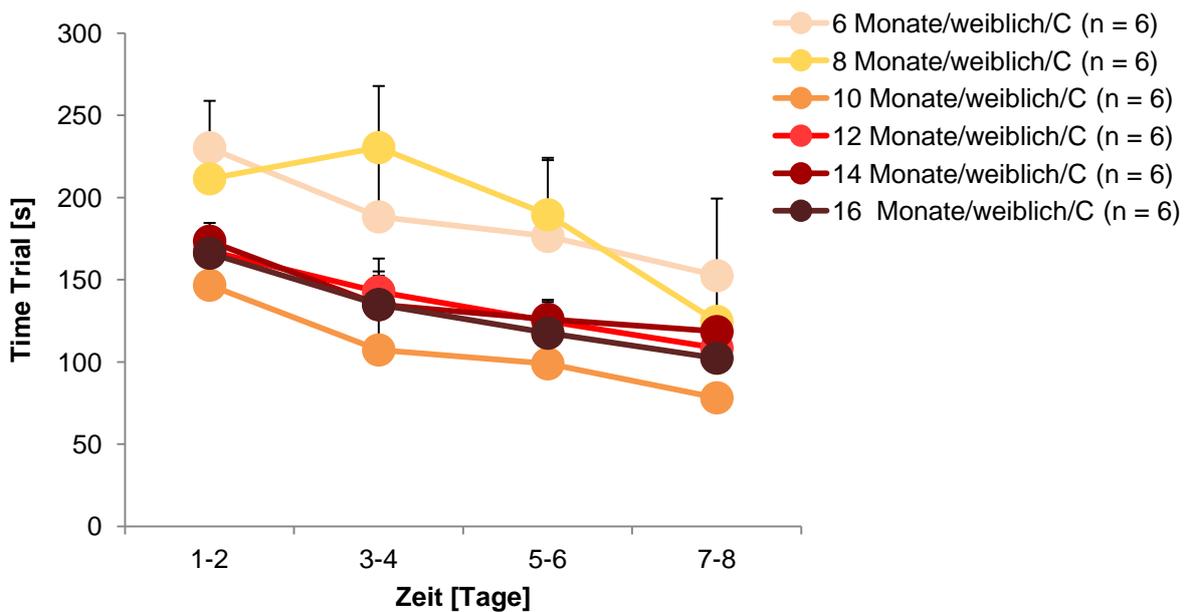
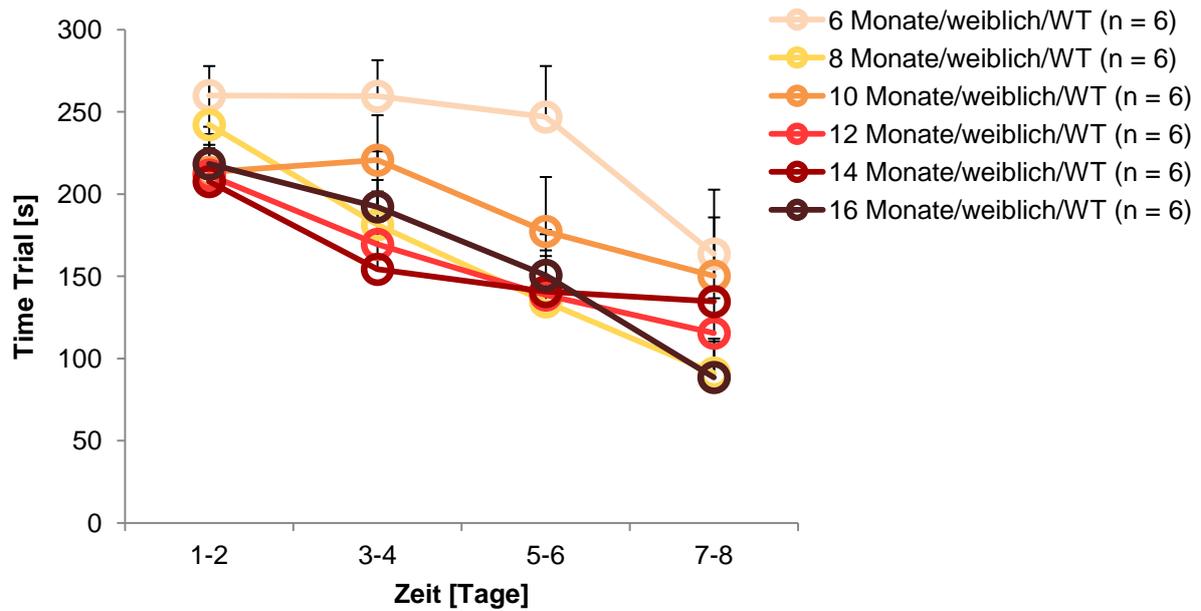
Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	182 ± 41	93 ± 29	75 ± 50	55 ± 33
6 Monate/männlich/C	184 ± 69	137 ± 72	98 ± 64	84 ± 67
6 Monate/weiblich/WT	260 ± 44	260 ± 54	247 ± 76	164 ± 96
6 Monate/weiblich/C	230 ± 70	188 ± 103	176 ± 117	153 ± 115
8 Monate/männlich/WT	234 ± 44	188 ± 68	159 ± 89	109 ± 52
8 Monate/männlich/C	166 ± 67	157 ± 94	128 ± 65	97 ± 40
8 Monate/weiblich/WT	242 ± 62	181 ± 67	134 ± 68	91 ± 47
8 Monate/weiblich/C	211 ± 66	230 ± 92	190 ± 81	125 ± 66
10 Monate/männlich/WT	215 ± 42	161 ± 42	156 ± 66	116 ± 68
10 Monate/männlich/C	199 ± 64	133 ± 77	129 ± 81	116 ± 86
10 Monate/weiblich/WT	213 ± 36	221 ± 67	177 ± 81	150 ± 87
10 Monate/weiblich/C	147 ± 59	107 ± 75	99 ± 54	78 ± 17
12 Monate/männlich/WT	218 ± 76	120 ± 58	106 ± 73	86 ± 64
12 Monate/männlich/C	173 ± 79	131 ± 46	99 ± 34	76 ± 11
12 Monate/weiblich/WT	212 ± 72	169 ± 79	139 ± 67	115 ± 52
12 Monate/weiblich/C	168 ± 27	143 ± 49	125 ± 29	108 ± 32
14 Monate/männlich/WT	197 ± 45	163 ± 64	153 ± 55	125 ± 48
14 Monate/männlich/C	134 ± 25	106 ± 28	90 ± 33	87 ± 34
14 Monate/weiblich/WT	208 ± 55	154 ± 71	141 ± 85	135 ± 88
14 Monate/weiblich/C	173 ± 73	135 ± 80	126 ± 69	119 ± 67
16 Monate/männlich/WT	209 ± 58	154 ± 75	141 ± 90	127 ± 87
16 Monate/männlich/C	171 ± 28	125 ± 29	110 ± 20	116 ± 31
16 Monate/weiblich/WT	218 ± 45	192 ± 83	151 ± 68	89 ± 58
16 Monate/weiblich/C	166 ± 24	135 ± 43	118 ± 27	102 ± 21

**Benötigte Gesamtzeit in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Alle Gruppen brauchen im Mittel weniger als 300 Sekunden pro Testdurchlauf. Dabei nimmt die für einen Durchlauf benötigte Gesamtzeit über die Versuchstage hinweg ab (Zeit:  $p < 0,001$ ). Insgesamt brauchen die Wildtypen signifikant mehr Zeit als die Carrier (Genotyp:  $p = 0,018$ ). Auch benötigen die weiblichen Tiere länger als die männlichen Tiere (Geschlecht:  $p = 0,016$ ), wobei die Interaktion mit dem Alter die Signifikanz verfehlt (Alter x Geschlecht:  $p = 0,086$ ) (siehe Tabelle 15 und Abbildung 22 und 23).



**Abbildung 22: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der benötigten Gesamtzeit (Time Trial) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**



**Abbildung 23:** Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der benötigten Gesamtzeit (Time Trial) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT

### 3.3.3.2 Verhaltensparameter

Die einzelnen Parameter lassen sich unterschiedlichen Verhaltensmustern zuordnen, die sich teilweise überschneiden: Angstverhalten, Erregung und Erkundungsverhalten.

Die für die jeweiligen Parameter errechneten Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen ( $\pm$  SD) sind den folgenden Tabellen zu entnehmen. In den ausgewählten Abbildungen sind Mittelwerte (MW) und Standardfehler ( $\pm$  SEM) angegeben.

### Angstverhalten

Es werden verschiedene Parameter ausgewertet, die Rückschlüsse auf das Angstverhalten im mHBT ziehen lassen. Darunter fallen die Zeit bis zum ersten Betreten des Boards (sog. „Latency First Board Entry“), die Anzahl der Boardbesuche (sog. „Number of Board Entries“), die Gesamtzeit auf dem Board (sog. „Time on Board“) und die Gesamtzeit der Immobilitätsphasen („Immobility“).

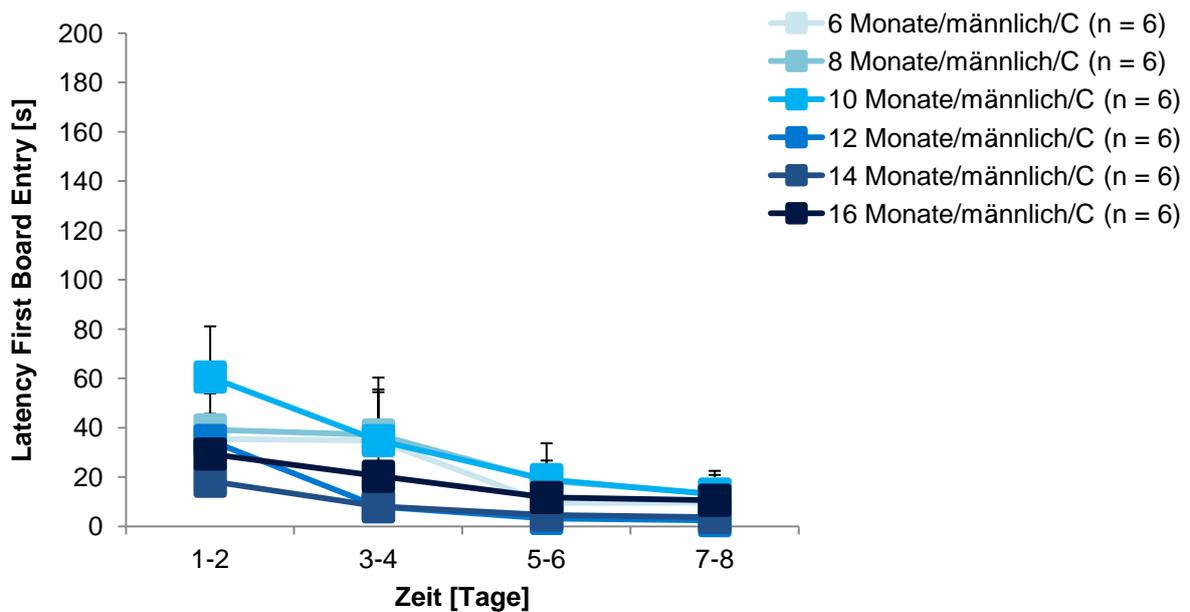
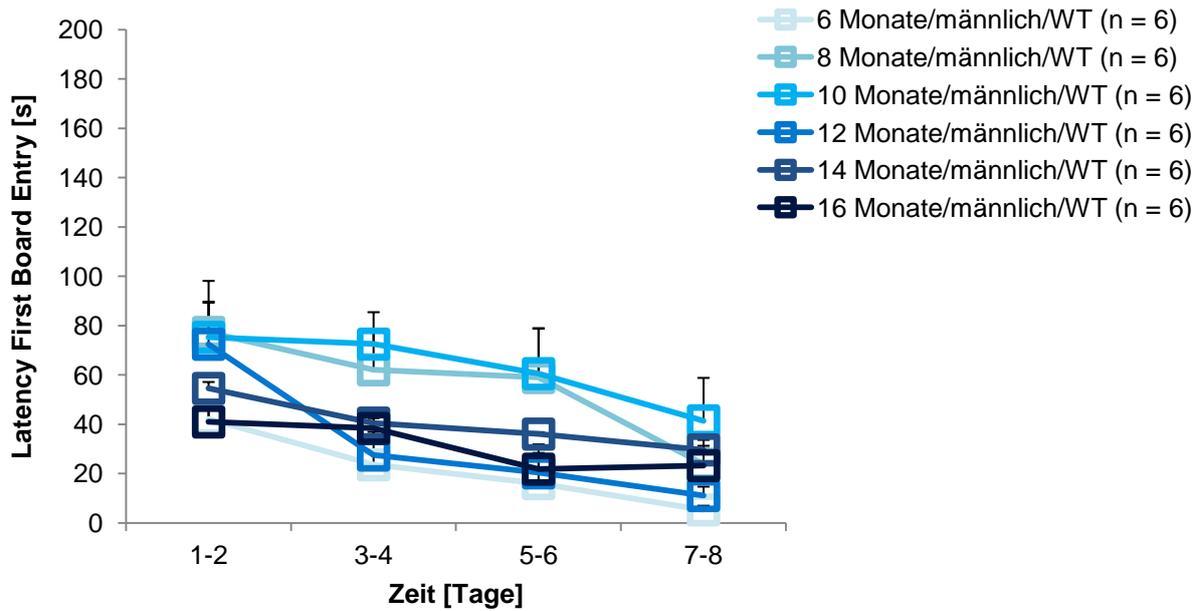
## Latency First Board Entry

**Tabelle 16: Zeit bis zum ersten Betreten des Boards aller 24 Gruppen im mHBT**

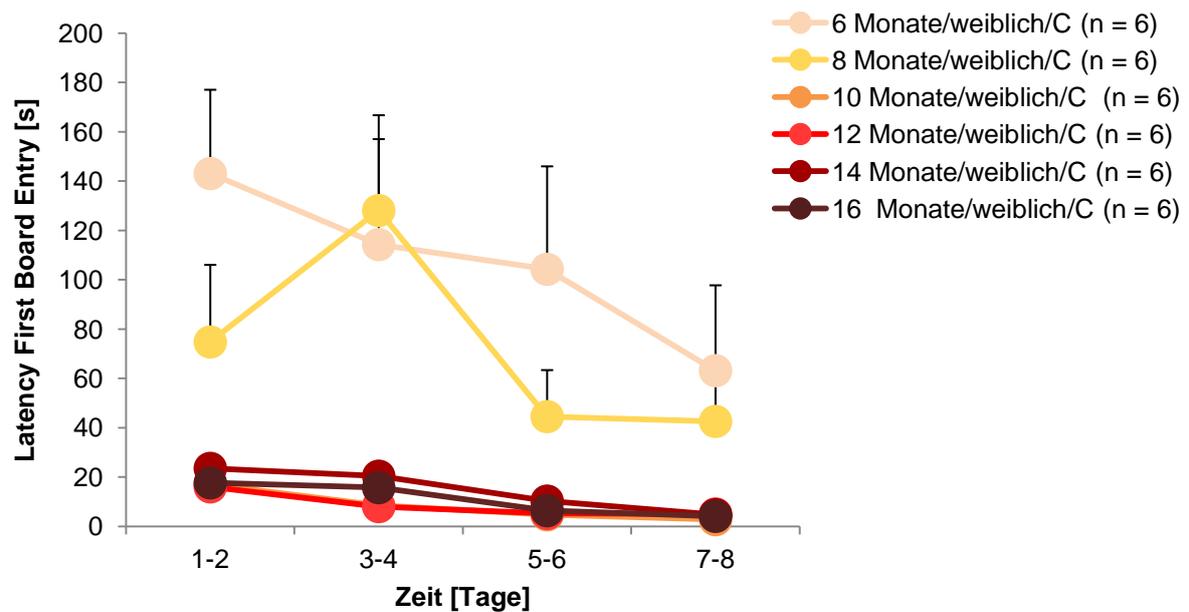
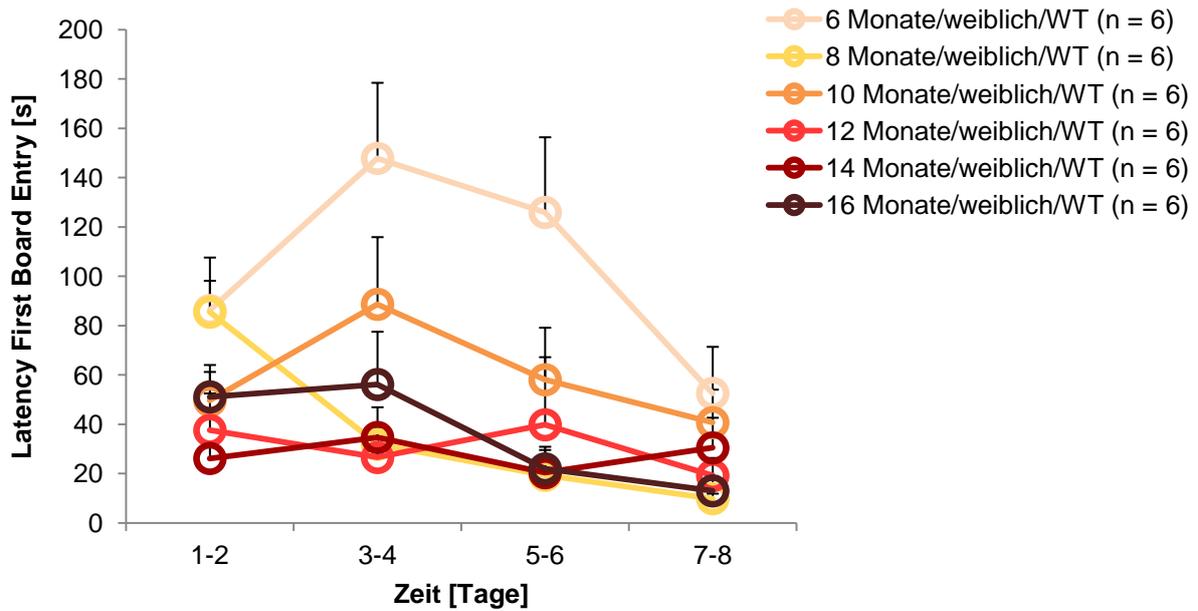
Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	42,1 ± 12,3	23,6 ± 13,1	16,0 ± 12,9	5,3 ± 4,1
6 Monate/männlich/C	35,5 ± 24,8	34,7 ± 51,0	9,5 ± 7,1	9,5 ± 13,1
6 Monate/weiblich/WT	86,2 ± 29,5	147,8 ± 75,1	125,9 ± 74,7	52,5 ± 46,3
6 Monate/weiblich/C	143,1 ± 83,3	114,3 ± 104,8	104,3 ± 102,2	63,2 ± 84,8
8 Monate/männlich/WT	77,3 ± 51,2	62,1 ± 37,5	59,0 ± 48,5	23,8 ± 18,4
8 Monate/männlich/C	39,1 ± 36,3	37,1 ± 42,6	18,4 ± 20,3	13,2 ± 18,9
8 Monate/weiblich/WT	85,5 ± 54,2	31,9 ± 17,0	19,4 ± 14,0	9,9 ± 5,0
8 Monate/weiblich/C	74,8 ± 76,6	128,1 ± 94,7	44,5 ± 46,2	42,6 ± 56,4
10 Monate/männlich/WT	75,3 ± 35,5	72,5 ± 31,8	60,6 ± 45,2	41,4 ± 42,6
10 Monate/männlich/C	60,6 ± 50,3	34,8 ± 62,6	19,0 ± 36,1	13,0 ± 23,4
10 Monate/weiblich/WT	49,7 ± 28,5	88,7 ± 66,8	58,1 ± 51,7	40,7 ± 32,8
10 Monate/weiblich/C	17,1 ± 17,2	8,5 ± 12,9	4,7 ± 5,6	2,8 ± 1,5
12 Monate/männlich/WT	72,5 ± 41,3	27,6 ± 23,0	20,4 ± 19,8	11,1 ± 8,9
12 Monate/männlich/C	34,8 ± 24,4	7,9 ± 7,4	3,2 ± 2,2	2,4 ± 1,1
12 Monate/weiblich/WT	37,6 ± 36,7	26,6 ± 32,1	39,8 ± 67,2	19,2 ± 17,6
12 Monate/weiblich/C	16,0 ± 8,3	8,0 ± 5,7	5,3 ± 3,6	5,1 ± 2,3
14 Monate/männlich/WT	54,6 ± 23,2	40,5 ± 21,7	36,1 ± 23,5	29,6 ± 25,4
14 Monate/männlich/C	18,3 ± 6,4	8,2 ± 4,9	4,6 ± 2,0	3,7 ± 1,0
14 Monate/weiblich/WT	26,2 ± 16,3	34,7 ± 30,0	20,4 ± 25,8	30,5 ± 30,0
14 Monate/weiblich/C	23,6 ± 15,5	20,4 ± 24,2	10,3 ± 9,4	4,8 ± 4,3
16 Monate/männlich/WT	41,0 ± 17,3	38,4 ± 18,2	21,8 ± 24,6	23,3 ± 25,6
16 Monate/männlich/C	29,4 ± 17,8	20,4 ± 31,3	11,7 ± 15,1	10,6 ± 14,9
16 Monate/weiblich/WT	51,1 ± 31,7	56,2 ± 52,5	22,0 ± 18,8	13,0 ± 14,7
16 Monate/weiblich/C	17,7 ± 10,2	15,7 ± 13,3	6,4 ± 3,8	4,1 ± 1,6

**Zeit bis zum ersten Betreten des Boards in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Insgesamt nimmt die Latenz bis zum ersten Betreten des Boards über die Versuchstage hinweg ab (Zeit:  $p < 0,001$ ). Die Carrier betreten das Board rascher als die Wildtypen (Genotyp:  $p = 0,005$ ). Zudem übt die Wechselwirkung des Geschlechts mit den Altersstufen einen signifikanten Effekt aus (Alter x Geschlecht:  $p < 0,001$ ): So brauchen die 6 Monate alten weiblichen Tiere verglichen mit den übrigen weiblichen Altersgruppen (6 Monate vs. 8, 10, 12, 14, 16 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) und verglichen mit den 6 Monate alten männlichen Tieren ( $p < 0,008$  (sig.)) eine signifikant längere Zeit bis sie das Board betreten (siehe Tabelle 16 und Abbildung 24 und 25).



**Abbildung 24:** Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Zeit bis zum ersten Betreten des Boards (Latency First Board Entry) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT



**Abbildung 25: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Zeit bis zum ersten Betreten des Boards (Latency First Board Entry) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**

## Number of Board Entries

**Tabelle 17: Anzahl der Boardbesuche aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	6,2 ± 2,2	4,1 ± 1,7	3,2 ± 1,0	3,0 ± 1,0
6 Monate/männlich/C	7,9 ± 2,8	5,1 ± 2,2	4,5 ± 0,9	3,4 ± 0,7
6 Monate/weiblich/WT	7,1 ± 1,2	3,6 ± 1,9	3,2 ± 2,1	3,7 ± 0,9
6 Monate/weiblich/C	3,1 ± 1,6	3,1 ± 2,2	2,7 ± 1,8	2,6 ± 1,3
8 Monate/männlich/WT	6,6 ± 4,5	3,1 ± 0,9	3,4 ± 1,7	3,7 ± 2,1
8 Monate/männlich/C	6,7 ± 2,0	5,3 ± 2,2	4,3 ± 1,2	4,1 ± 0,6
8 Monate/weiblich/WT	6,4 ± 3,0	5,2 ± 1,8	4,7 ± 0,5	4,0 ± 0,8
8 Monate/weiblich/C	9,0 ± 4,0	4,0 ± 2,2	5,9 ± 2,2	4,9 ± 2,3
10 Monate/männlich/WT	5,4 ± 1,3	4,4 ± 0,7	4,0 ± 1,4	3,4 ± 0,8
10 Monate/männlich/C	7,5 ± 3,1	6,1 ± 2,9	6,1 ± 2,2	4,1 ± 1,7
10 Monate/weiblich/WT	7,8 ± 4,7	6,0 ± 4,6	4,5 ± 1,6	4,2 ± 1,8
10 Monate/weiblich/C	8,0 ± 1,9	6,9 ± 2,9	5,8 ± 2,7	4,1 ± 2,0
12 Monate/männlich/WT	5,9 ± 1,5	4,8 ± 1,5	4,2 ± 1,0	4,3 ± 1,1
12 Monate/männlich/C	9,4 ± 1,8	9,0 ± 3,8	6,2 ± 1,1	3,9 ± 0,9
12 Monate/weiblich/WT	6,5 ± 1,4	4,7 ± 2,4	3,6 ± 1,3	3,6 ± 1,3
12 Monate/weiblich/C	13,9 ± 11,4	14,4 ± 14,6	12,5 ± 11,5	11,1 ± 8,1
14 Monate/männlich/WT	6,0 ± 0,9	5,4 ± 0,4	5,4 ± 0,6	4,4 ± 1,0
14 Monate/männlich/C	7,1 ± 0,9	7,1 ± 1,7	5,3 ± 1,1	4,5 ± 1,0
14 Monate/weiblich/WT	10,1 ± 5,4	6,1 ± 3,1	5,3 ± 1,8	4,9 ± 1,6
14 Monate/weiblich/C	8,2 ± 4,4	6,2 ± 1,8	5,5 ± 1,9	5,8 ± 2,1
16 Monate/männlich/WT	6,8 ± 1,5	5,2 ± 0,9	4,8 ± 0,8	3,8 ± 1,1
16 Monate/männlich/C	8,2 ± 2,0	5,2 ± 1,1	5,1 ± 1,4	5,2 ± 2,0
16 Monate/weiblich/WT	8,3 ± 1,9	6,3 ± 4,4	6,2 ± 4,4	5,4 ± 2,8
16 Monate/weiblich/C	9,0 ± 3,8	7,5 ± 5,8	6,8 ± 4,0	6,9 ± 4,0

**Anzahl der Boardbesuche pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Über den Versuchszeitraum nimmt die Anzahl der Boardbesuche in allen Gruppen ab (Zeit:  $p < 0,001$ ). Insgesamt betreten die Carrier das Board häufiger als die Wildtypen (Genotyp:  $p = 0,014$ ). Zudem übt das Alter einen signifikanten Effekt aus (Alter:  $p = 0,026$ ) in der Art, dass die 12 Monate alten Tiere die häufigsten Boardbesuche aufweisen (12 Monate vs. 6 Monate:  $p < 0,003$  (sig.)). Dies wirkt sich tendenziell besonders auf die 12 Monate alten Carrier aus, verfehlt dabei aber knapp die Signifikanz (Alter x Genotyp:  $p = 0,061$ ) (siehe Tabelle 17; auf eine graphische Darstellung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet).

## Time on Board

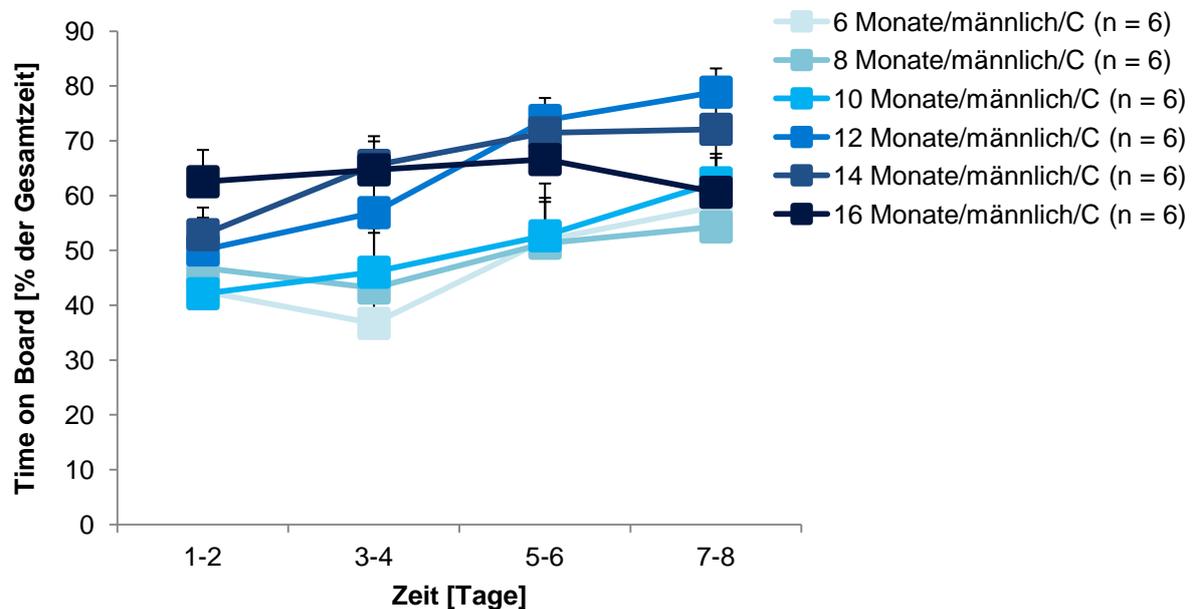
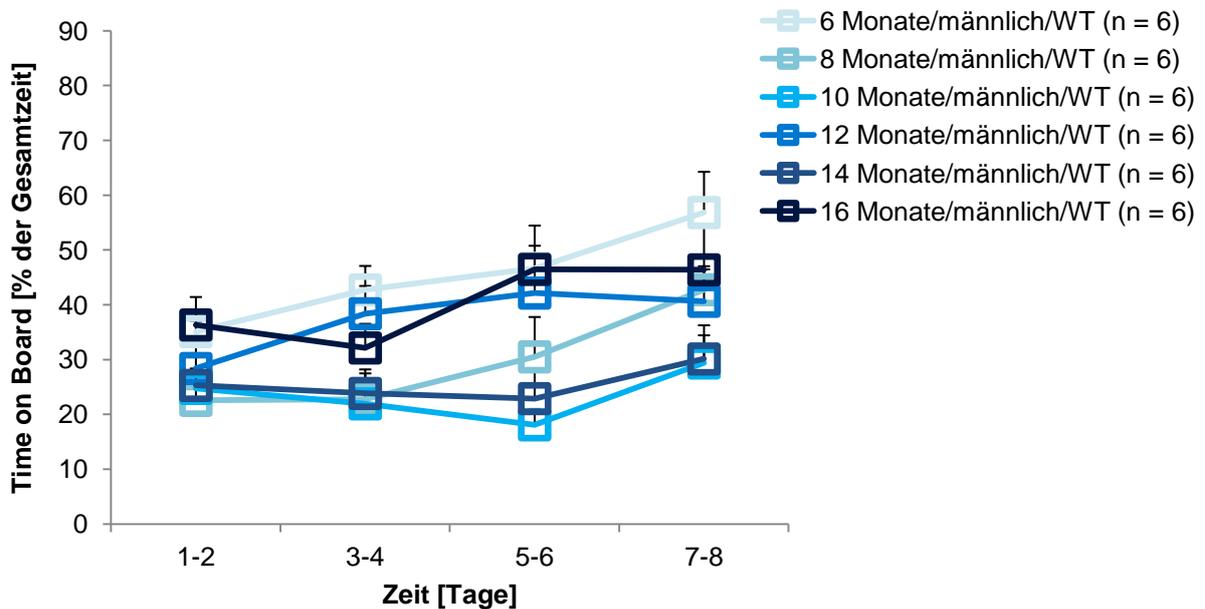
**Tabelle 18: Gesamtzeit auf dem Board aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	35,1 ± 4,9	42,7 ± 10,7	46,7 ± 10,1	56,9 ± 18,2
6 Monate/männlich/C	42,6 ± 19,7	36,7 ± 11,3	51,9 ± 18,9	58,0 ± 21,7
6 Monate/weiblich/WT	21,9 ± 9,6	10,4 ± 7,7	10,8 ± 11,2	28,7 ± 16,9
6 Monate/weiblich/C	20,2 ± 14,8	25,1 ± 23,2	26,2 ± 25,4	33,1 ± 24,1
8 Monate/männlich/WT	22,6 ± 8,0	22,8 ± 11,6	30,5 ± 17,8	42,8 ± 10,5
8 Monate/männlich/C	46,8 ± 19,5	43,2 ± 24,7	51,3 ± 18,5	54,3 ± 15,5
8 Monate/weiblich/WT	28,1 ± 9,7	31,3 ± 13,2	35,7 ± 11,1	41,7 ± 15,8
8 Monate/weiblich/C	32,3 ± 16,1	20,8 ± 20,3	32,4 ± 19,6	47,6 ± 20,4
10 Monate/männlich/WT	24,8 ± 6,4	22,0 ± 6,1	18,1 ± 7,1	29,4 ± 16,8
10 Monate/männlich/C	42,1 ± 21,9	46,0 ± 19,8	52,7 ± 23,4	62,4 ± 27,8
10 Monate/weiblich/WT	32,6 ± 8,4	21,0 ± 12,3	27,6 ± 17,6	29,5 ± 18,2
10 Monate/weiblich/C	63,0 ± 18,8	65,3 ± 16,1	72,4 ± 17,5	73,5 ± 18,6
12 Monate/männlich/WT	28,4 ± 10,9	38,4 ± 12,4	42,2 ± 17,4	40,7 ± 14,3
12 Monate/männlich/C	50,1 ± 19,0	56,9 ± 15,5	73,7 ± 10,0	78,9 ± 10,6
12 Monate/weiblich/WT	41,8 ± 16,1	44,8 ± 26,1	44,2 ± 18,4	48,3 ± 19,6
12 Monate/weiblich/C	66,5 ± 8,7	68,3 ± 11,3	71,4 ± 12,8	68,9 ± 6,9
14 Monate/männlich/WT	25,3 ± 6,8	23,8 ± 7,7	22,9 ± 9,3	30,1 ± 9,1
14 Monate/männlich/C	52,9 ± 7,6	65,5 ± 10,7	71,5 ± 12,3	72,1 ± 10,6
14 Monate/weiblich/WT	39,5 ± 5,5	33,9 ± 7,6	37,7 ± 15,5	35,3 ± 15,5
14 Monate/weiblich/C	62,9 ± 17,4	60,4 ± 19,1	65,0 ± 16,1	73,4 ± 13,6
16 Monate/männlich/WT	36,3 ± 12,5	32,1 ± 10,8	46,5 ± 19,6	46,4 ± 20,5
16 Monate/männlich/C	62,6 ± 14,2	64,7 ± 15,0	66,6 ± 13,9	60,6 ± 17,2
16 Monate/weiblich/WT	34,9 ± 12,6	30,4 ± 19,5	39,3 ± 13,5	45,7 ± 10,0
16 Monate/weiblich/C	67,8 ± 17,1	69,1 ± 19,4	70,2 ± 18,4	78,4 ± 11,2

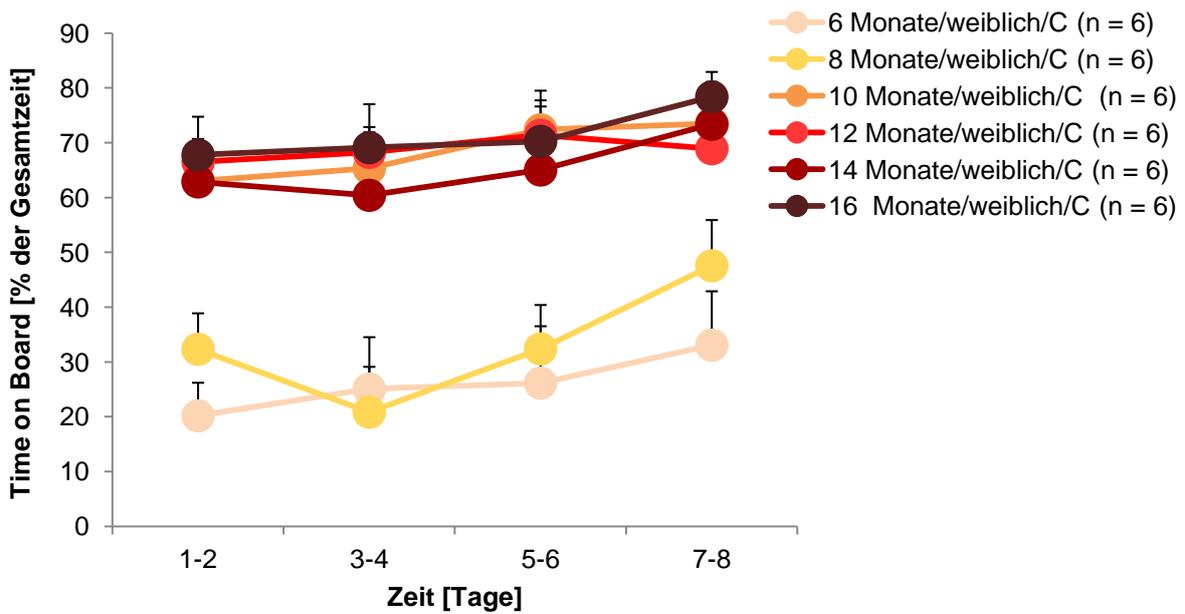
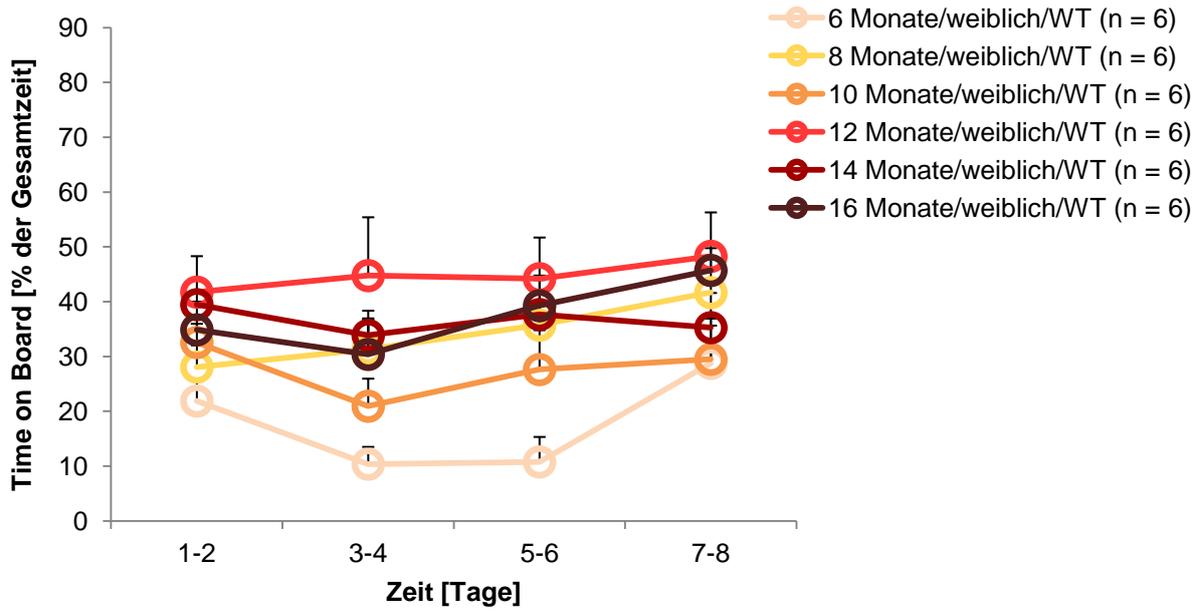
**Gesamtzeit auf dem Board in Prozent der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Über die Versuchstage hinweg steigt die anteilig auf dem Board verbrachte Zeit insgesamt an (Zeit:  $p < 0,001$ ). Die prozentuale Gesamtzeit auf dem Board ist bei Carriern geschlechtsunabhängig höher als bei Wildtypen (Genotyp:  $p < 0,001$ ), wobei die Unterschiede ab 10 Monaten (jeweils  $p < 0,008$  (sig.)) stärker ausgeprägt sind als bei jüngeren Tieren (Alter x Genotyp:  $p = 0,001$ ). Die Interaktion von Alter und Geschlecht nimmt einen signifikanten Einfluss auf die auf dem Board verbrachte Zeit (Alter x Geschlecht:  $p < 0,001$ ): Im Alter von 6 Monaten halten sich die weiblichen Tiere signifikant kürzer auf dem Board auf als die männlichen Tiere gleichen Alters ( $p < 0,008$  (sig.)). Zudem verbringen die 6 und 8 Monate alten weiblichen Tiere weniger Zeit auf dem Board als die weiblichen Tiere höheren Alters (6

Monate vs. 10, 12, 14, 16 Monate:  $p < 0,002$  (sig.) (8 Monate vs. 12, 16 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (siehe Tabelle 18 und Abbildung 26 und 27).



**Abbildung 26:** Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Gesamtzeit auf dem Board (Time on Board) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT



**Abbildung 27: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der Gesamtzeit auf dem Board (Time on Board) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**

## Immobility

**Tabelle 19: Gesamtzeit der Immobilitätsphasen aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	0,5 ± 1,1	1,5 ± 3,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
6 Monate/männlich/C	1,5 ± 2,2	3,1 ± 5,6	0,8 ± 1,8	3,6 ± 8,1
6 Monate/weiblich/WT	4,3 ± 6,1	17,2 ± 13,4	31,2 ± 22,6	18,6 ± 21,4
6 Monate/weiblich/C	25,3 ± 20,3	31,9 ± 30,3	32,3 ± 32,6	20,9 ± 23,5
8 Monate/männlich/WT	3,9 ± 4,2	4,2 ± 6,0	4,6 ± 6,3	1,7 ± 1,7
8 Monate/männlich/C	0,0 ± 0,0	2,0 ± 4,2	0,8 ± 1,5	1,4 ± 3,1
8 Monate/weiblich/WT	10,0 ± 17,5	6,8 ± 8,4	3,7 ± 7,0	3,8 ± 8,1
8 Monate/weiblich/C	6,7 ± 9,7	15,9 ± 13,9	10,4 ± 8,6	6,1 ± 10,0
10 Monate/männlich/WT	0,7 ± 1,1	3,0 ± 4,7	3,3 ± 6,2	1,7 ± 2,2
10 Monate/männlich/C	0,8 ± 1,5	1,6 ± 3,6	0,7 ± 1,6	1,0 ± 2,2
10 Monate/weiblich/WT	5,9 ± 7,7	10,7 ± 14,3	8,6 ± 11,0	9,6 ± 12,6
10 Monate/weiblich/C	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
12 Monate/männlich/WT	1,8 ± 2,5	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,3
12 Monate/männlich/C	0,3 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
12 Monate/weiblich/WT	3,0 ± 4,4	3,3 ± 5,7	7,5 ± 14,3	4,5 ± 6,9
12 Monate/weiblich/C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,8	0,0 ± 0,0
14 Monate/männlich/WT	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,1	2,2 ± 2,2	0,4 ± 0,7
14 Monate/männlich/C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1	0,5 ± 1,1
14 Monate/weiblich/WT	1,2 ± 2,7	4,1 ± 9,1	1,2 ± 2,6	0,2 ± 0,4
14 Monate/weiblich/C	0,0 ± 0,0	0,8 ± 1,7	1,1 ± 2,4	2,2 ± 4,9
16 Monate/männlich/WT	5,4 ± 11,9	6,8 ± 14,7	7,6 ± 16,8	7,7 ± 15,5
16 Monate/männlich/C	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,8
16 Monate/weiblich/WT	2,2 ± 3,0	4,1 ± 3,8	2,0 ± 3,2	1,3 ± 2,9
16 Monate/weiblich/C	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

**Gesamtzeit der Immobilitätsphasen in Prozent der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Der prozentuale Anteil der Immobilitätsphasen pro Durchlauf verändert sich im Untersuchungszeitraum nicht signifikant (Zeit:  $p > 0,05$ ). Der Genotyp hat keinen maßgeblichen Einfluss auf die Immobilität (Genotyp:  $p > 0,05$ ). Allerdings übt die Interaktion von Alter mit Geschlecht einen signifikanten Effekt aus (Alter x Geschlecht:  $p < 0,001$ ): Die Immobilität ist bei den 6 Monate alten weiblichen Tieren signifikant stärker ausgeprägt als in höherem Alter (6 Monate vs. 8, 10, 12, 14, 16 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)). Ebenso weisen die 6 Monate alten weiblichen Tiere eine höhere Immobilität auf als die 6 Monate alten männlichen Tiere ( $p < 0,008$  (sig.)) (siehe Tabelle 19; auf eine graphische Darstellung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet).

## Erregung

Die Erregung wird durch den prozentualen Anteil der Putzphasen („sog. Grooming“) erfasst.

## **Grooming**

**Tabelle 20: Gesamtzeit der Putzphasen aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	1,8 ± 3,6	1,3 ± 2,8	3,6 ± 4,7	3,3 ± 5,1
6 Monate/männlich/C	1,2 ± 1,8	2,4 ± 4,5	3,0 ± 6,7	1,2 ± 2,7
6 Monate/weiblich/WT	4,0 ± 2,6	7,7 ± 4,1	5,3 ± 2,6	5,5 ± 5,4
6 Monate/weiblich/C	2,1 ± 1,5	3,7 ± 2,1	1,7 ± 1,1	3,3 ± 2,9
8 Monate/männlich/WT	0,7 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,8 ± 0,8	1,3 ± 1,2
8 Monate/männlich/C	0,0 ± 0,1	0,3 ± 0,7	0,3 ± 0,6	0,1 ± 0,1
8 Monate/weiblich/WT	2,8 ± 1,5	1,3 ± 1,1	2,3 ± 1,7	1,8 ± 1,6
8 Monate/weiblich/C	1,1 ± 1,1	1,5 ± 1,2	2,4 ± 2,6	0,2 ± 0,5
10 Monate/männlich/WT	1,5 ± 1,4	4,5 ± 3,3	4,5 ± 3,0	7,0 ± 9,9
10 Monate/männlich/C	0,2 ± 0,3	1,1 ± 2,0	1,3 ± 2,0	0,7 ± 1,7
10 Monate/weiblich/WT	2,2 ± 2,3	4,0 ± 3,2	4,6 ± 5,0	3,0 ± 2,9
10 Monate/weiblich/C	0,2 ± 0,3	0,8 ± 1,4	1,2 ± 2,6	0,8 ± 1,5
12 Monate/männlich/WT	2,1 ± 2,2	2,5 ± 2,5	2,0 ± 2,4	1,9 ± 2,5
12 Monate/männlich/C	0,4 ± 0,9	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2
12 Monate/weiblich/WT	2,0 ± 1,5	5,9 ± 7,2	4,2 ± 5,5	4,2 ± 3,7
12 Monate/weiblich/C	0,3 ± 0,4	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
14 Monate/männlich/WT	2,0 ± 1,7	4,0 ± 3,4	4,0 ± 3,8	4,9 ± 4,1
14 Monate/männlich/C	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,7	1,1 ± 1,3	0,8 ± 1,3
14 Monate/weiblich/WT	2,2 ± 2,9	3,4 ± 4,3	3,6 ± 6,1	5,2 ± 8,7
14 Monate/weiblich/C	0,9 ± 1,4	1,6 ± 2,4	0,6 ± 0,8	1,4 ± 2,9
16 Monate/männlich/WT	1,3 ± 1,7	2,2 ± 3,0	3,1 ± 4,2	3,8 ± 5,3
16 Monate/männlich/C	0,6 ± 1,2	1,6 ± 1,7	0,2 ± 0,3	0,7 ± 1,1
16 Monate/weiblich/WT	2,9 ± 3,4	7,5 ± 9,5	8,0 ± 8,3	4,3 ± 5,0
16 Monate/weiblich/C	1,3 ± 1,5	0,9 ± 1,4	0,5 ± 0,4	0,0 ± 0,0

**Gesamtzeit der Putzphasen in Prozent der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Der prozentuale Anteil der Putzphasen pro Testdurchlauf ist bei den Wildtypen maßgeblich höher als bei den Carriern (Genotyp:  $p < 0,001$ ). Geschlechtsabhängige signifikante Differenzen sind nicht festzustellen (Geschlecht:  $p = 1,00$ ) (siehe Tabelle 20; auf eine graphische Darstellung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet).

## Erkundungsverhalten

Zur Bestimmung der zielgerichteten Exploration wird die Anzahl der besuchten richtigen Löcher (sog. „Correct Hole Visits“) und im Rahmen ungerichteter Exploration die Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (sog. „Rearings“) ausgewertet.

### **Correct Hole Visits**

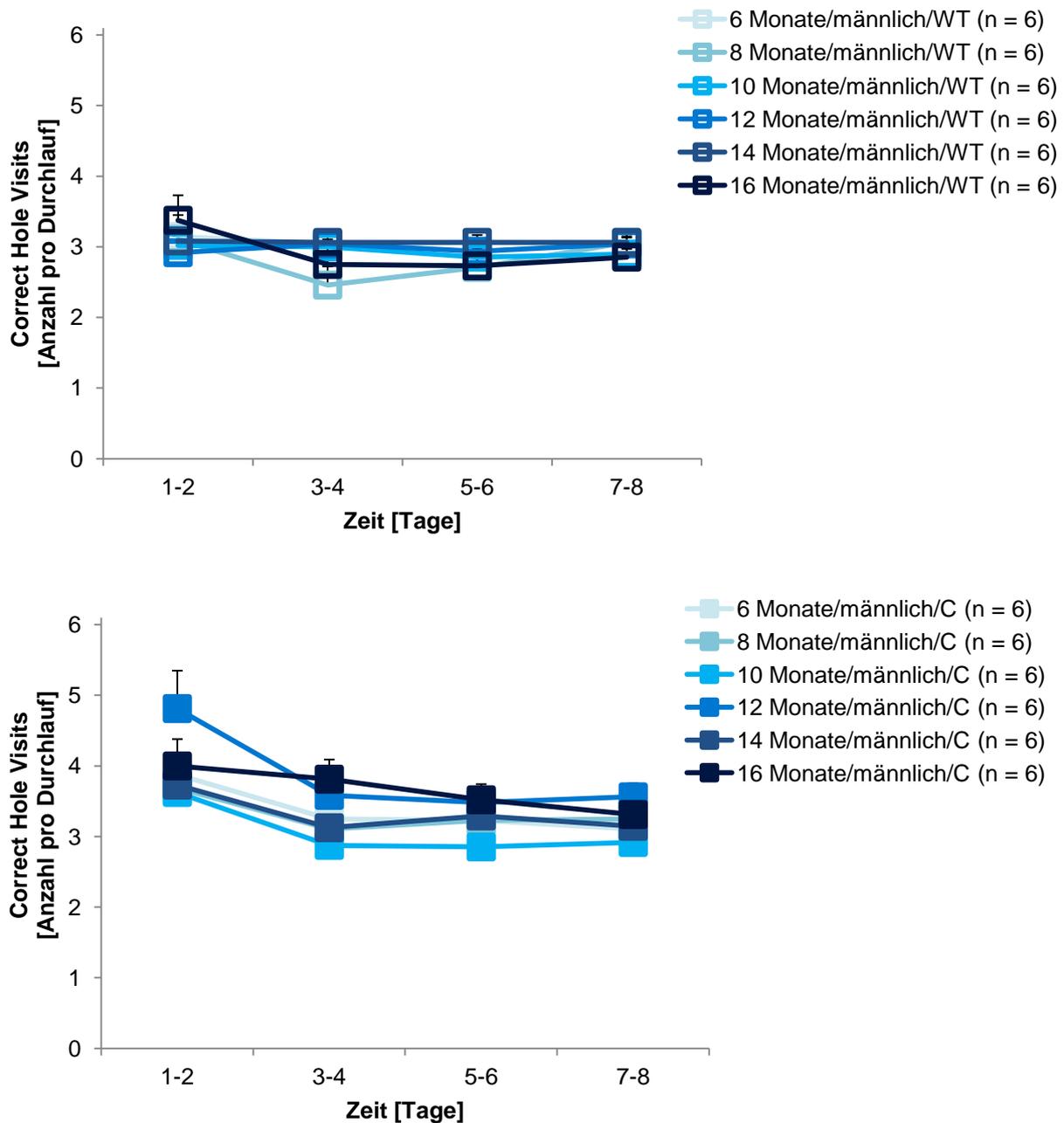
**Tabelle 21: Anzahl der besuchten richtigen Löcher aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	3,1 ± 0,4	3,0 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1
6 Monate/männlich/C	3,9 ± 0,7	3,3 ± 1,0	3,2 ± 0,4	3,1 ± 0,3
6 Monate/weiblich/WT	2,7 ± 0,9	1,7 ± 0,9	1,6 ± 1,1	2,4 ± 0,8
6 Monate/weiblich/C	1,8 ± 1,1	1,9 ± 1,3	1,7 ± 1,4	2,1 ± 1,3
8 Monate/männlich/WT	3,1 ± 0,8	2,5 ± 0,6	2,7 ± 0,7	3,1 ± 0,4
8 Monate/männlich/C	3,7 ± 0,8	3,1 ± 0,6	3,2 ± 0,4	3,3 ± 0,3
8 Monate/weiblich/WT	2,1 ± 1,3	2,6 ± 0,8	2,9 ± 0,4	3,0 ± 0,2
8 Monate/weiblich/C	3,7 ± 2,4	2,8 ± 1,9	3,1 ± 0,6	3,4 ± 0,3
10 Monate/männlich/WT	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,4	2,9 ± 0,2
10 Monate/männlich/C	3,6 ± 1,0	2,9 ± 1,2	2,9 ± 0,7	2,9 ± 0,6
10 Monate/weiblich/WT	3,4 ± 0,8	2,9 ± 1,0	2,7 ± 0,7	2,9 ± 0,3
10 Monate/weiblich/C	3,9 ± 0,6	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,5	3,5 ± 0,4
12 Monate/männlich/WT	2,9 ± 0,6	3,0 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,3
12 Monate/männlich/C	4,8 ± 1,3	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,6	3,6 ± 0,5
12 Monate/weiblich/WT	3,6 ± 0,5	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,3
12 Monate/weiblich/C	5,0 ± 2,6	4,4 ± 1,2	4,4 ± 1,3	3,9 ± 0,9
14 Monate/männlich/WT	3,1 ± 0,4	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,1
14 Monate/männlich/C	3,7 ± 0,5	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,3	3,1 ± 0,2
14 Monate/weiblich/WT	3,4 ± 0,5	3,2 ± 0,7	2,8 ± 0,3	2,9 ± 0,2
14 Monate/weiblich/C	3,6 ± 0,6	3,2 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,2
16 Monate/männlich/WT	3,4 ± 0,9	2,8 ± 0,8	2,7 ± 0,9	2,9 ± 0,4
16 Monate/männlich/C	4,0 ± 0,9	3,8 ± 0,7	3,5 ± 0,3	3,3 ± 0,3
16 Monate/weiblich/WT	3,1 ± 0,7	2,9 ± 1,1	3,2 ± 0,5	3,1 ± 0,2
16 Monate/weiblich/C	4,0 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,5 ± 0,6	3,4 ± 0,4

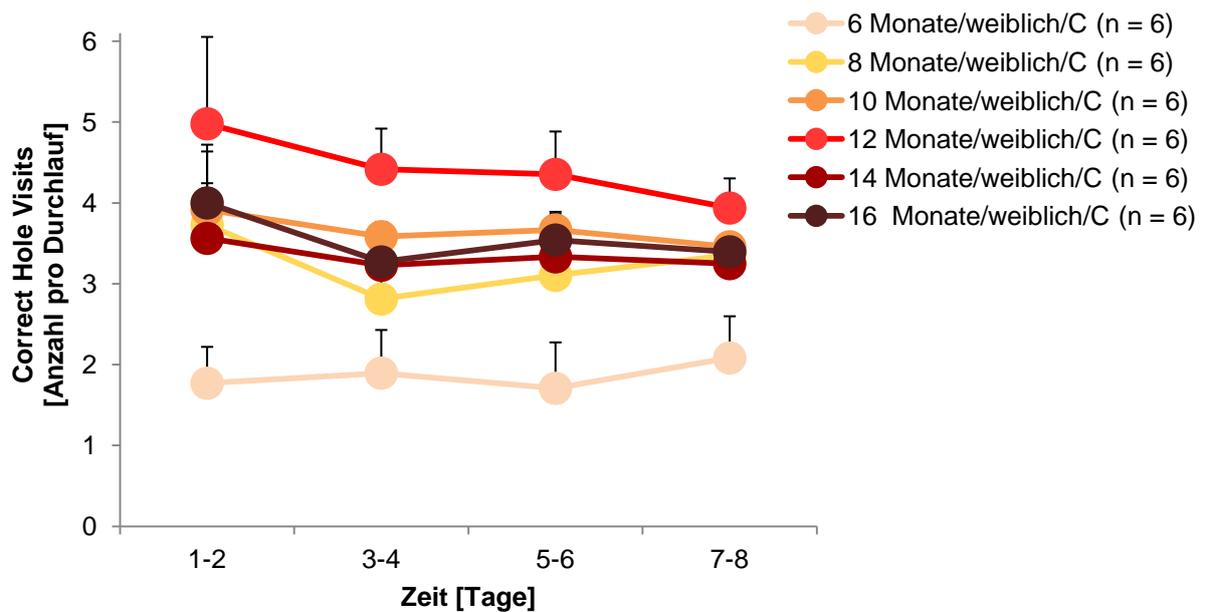
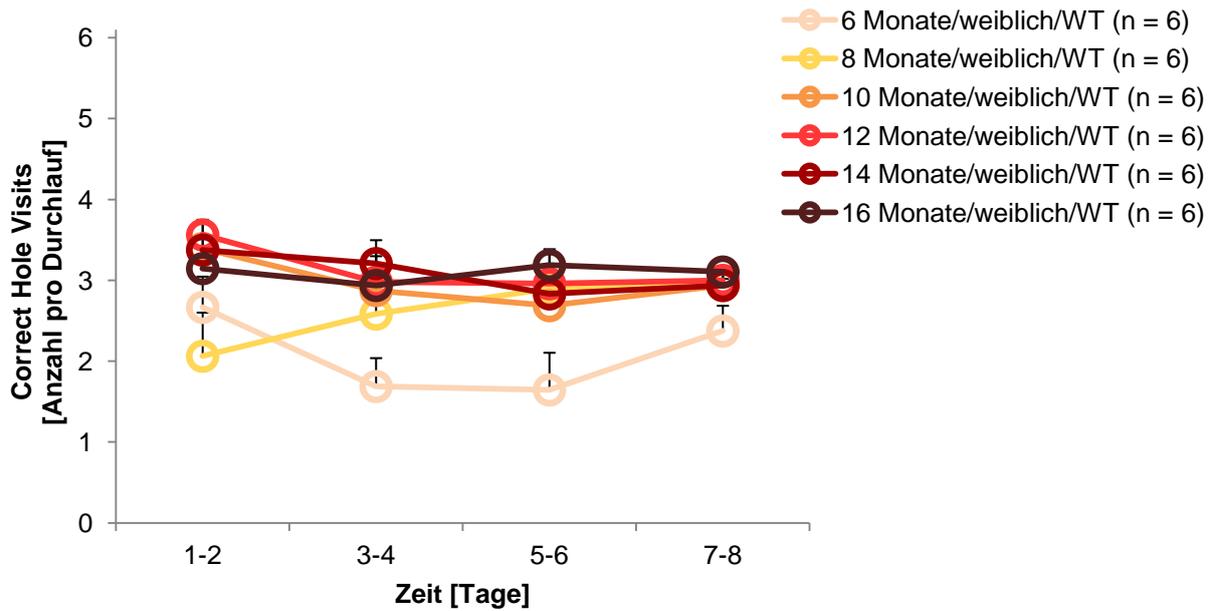
**Anzahl der besuchten richtigen Löcher pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Insgesamt besuchen die Carrier häufiger die richtigen Löcher als die Wildtypen (Genotyp:  $p < 0,001$ ). Tendenziell am stärksten ausgeprägt ist dieser Unterschied beim Vergleich der 12 Monate alten weiblichen Carrier mit den 12 Monate alten weiblichen Wildtypen ( $p = 0,002$ ). Die Interaktion zwischen Alter und Geschlecht ist signifikant (Alter x Geschlecht:  $p = 0,002$ ): Die 6 Monate alten weiblichen Tiere besuchen weniger richtige Löcher als alle älteren

weiblichen Tiere (6 Monate vs. 8, 10, 12, 14, 16 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)). Ebenfalls im Alter von 6 Monaten machen die weiblichen Tiere weniger richtige Lochbesuche als die 6 Monate alten männlichen Tiere ( $p < 0,008$  (sig.)) (siehe Tabelle 21 und Abbildung 28 und 29).



**Abbildung 28: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der besuchten richtigen Löcher (Correct Hole Visits) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**



**Abbildung 29: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der besuchten richtigen Löcher (Correct Hole Visits) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**

## Rearings

**Tabelle 22: Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	9,8 ± 8,7	5,3 ± 5,6	1,8 ± 1,1	1,2 ± 0,7
6 Monate/männlich/C	11,2 ± 12,3	3,1 ± 3,1	2,8 ± 3,0	2,2 ± 2,0
6 Monate/weiblich/WT	10,8 ± 3,8	8,7 ± 4,3	5,8 ± 2,9	3,1 ± 1,9
6 Monate/weiblich/C	6,3 ± 1,8	2,4 ± 1,3	3,3 ± 2,2	2,9 ± 1,2
8 Monate/männlich/WT	8,1 ± 4,1	3,3 ± 1,3	2,4 ± 0,6	2,3 ± 1,0
8 Monate/männlich/C	7,0 ± 4,9	2,3 ± 2,0	2,1 ± 2,1	1,9 ± 1,4
8 Monate/weiblich/WT	14,9 ± 11,2	10,2 ± 4,1	6,2 ± 2,0	4,3 ± 1,7
8 Monate/weiblich/C	13,3 ± 4,0	5,7 ± 4,0	5,4 ± 2,7	1,0 ± 1,0
10 Monate/männlich/WT	9,4 ± 3,2	6,5 ± 2,7	4,8 ± 2,7	2,6 ± 1,7
10 Monate/männlich/C	10,2 ± 6,7	3,0 ± 2,2	4,8 ± 6,2	2,6 ± 3,8
10 Monate/weiblich/WT	10,2 ± 3,4	5,6 ± 1,6	3,8 ± 1,5	3,5 ± 1,7
10 Monate/weiblich/C	8,0 ± 3,9	1,0 ± 0,8	0,8 ± 0,9	0,4 ± 0,5
12 Monate/männlich/WT	11,5 ± 3,1	7,4 ± 3,9	5,2 ± 4,9	5,6 ± 6,5
12 Monate/männlich/C	6,8 ± 6,4	2,5 ± 1,3	1,3 ± 0,8	0,4 ± 0,5
12 Monate/weiblich/WT	11,5 ± 6,5	4,6 ± 3,1	3,2 ± 1,9	3,4 ± 2,5
12 Monate/weiblich/C	5,2 ± 4,1	1,7 ± 1,6	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,8
14 Monate/männlich/WT	11,0 ± 4,5	7,3 ± 1,8	4,8 ± 1,4	3,8 ± 0,7
14 Monate/männlich/C	6,9 ± 1,6	4,2 ± 1,4	2,0 ± 0,7	1,4 ± 1,4
14 Monate/weiblich/WT	12,1 ± 4,9	4,4 ± 2,0	5,4 ± 3,9	3,5 ± 2,8
14 Monate/weiblich/C	3,9 ± 2,2	2,6 ± 2,3	1,2 ± 1,9	1,4 ± 1,4
16 Monate/männlich/WT	10,0 ± 3,3	7,5 ± 3,4	5,0 ± 3,6	3,3 ± 2,6
16 Monate/männlich/C	4,9 ± 1,9	3,5 ± 1,5	2,7 ± 1,3	2,8 ± 2,7
16 Monate/weiblich/WT	14,0 ± 6,0	5,3 ± 3,7	4,7 ± 3,5	3,4 ± 1,7
16 Monate/weiblich/C	11,2 ± 9,3	3,9 ± 5,3	2,4 ± 3,5	1,8 ± 3,0

**Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Über den Untersuchungszeitraum von acht Tagen nimmt die Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine ab (Zeit:  $p < 0,001$ ). Insgesamt machen die Carrier signifikant weniger oft Männchen als die Wildtypen (Genotyp:  $p < 0,001$ ). Daneben ergibt sich eine signifikante Interaktion zwischen Alter und Geschlecht, indem die weiblichen Tiere im Alter von 8 Monaten häufiger Männchen machen als die gleichalten männlichen Tiere ( $p < 0,008$  (sig.)) (Alter x Geschlecht:  $p = 0,02$ ) (siehe Tabelle 22; auf eine graphische Darstellung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet).

### 3.3.3.3 Motorische Parameter

Die Anzahl der Linienüberschreitungen im mHBT (sog. „Line Crossings“) spiegelt die allgemeine Bewegungsaktivität wieder, während die zum Fressen einer Futterbelohnung benötigte Zeit (sog. „Time Food Intake“) der Beurteilung der Feinmotorik dient. In tabellarischer Form sind die errechneten Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen ( $\pm$  SD) angegeben. Die Abbildungen zeigen graphische Darstellungen der Mittelwerte (MW) und Standardfehler ( $\pm$  SEM).

#### Line Crossings

**Tabelle 23: Anzahl der Linienüberschreitungen aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	18,9 $\pm$ 9,2	21,5 $\pm$ 12,4	18,6 $\pm$ 9,8	16,1 $\pm$ 9,3
6 Monate/männlich/C	15,8 $\pm$ 7,3	18,3 $\pm$ 10,4	21,9 $\pm$ 16,6	19,8 $\pm$ 12,4
6 Monate/weiblich/WT	12,9 $\pm$ 5,0	10,0 $\pm$ 6,2	12,7 $\pm$ 14,6	20,9 $\pm$ 13,0
6 Monate/weiblich/C	9,2 $\pm$ 4,6	11,3 $\pm$ 9,1	13,0 $\pm$ 9,1	14,6 $\pm$ 8,5
8 Monate/männlich/WT	19,8 $\pm$ 21,6	15,1 $\pm$ 13,5	18,6 $\pm$ 17,9	18,1 $\pm$ 15,1
8 Monate/männlich/C	18,4 $\pm$ 6,5	17,3 $\pm$ 10,1	12,7 $\pm$ 7,8	15,0 $\pm$ 7,5
8 Monate/weiblich/WT	12,1 $\pm$ 6,7	16,5 $\pm$ 8,7	15,9 $\pm$ 6,3	21,3 $\pm$ 8,2
8 Monate/weiblich/C	21,9 $\pm$ 9,1	14,4 $\pm$ 5,8	14,6 $\pm$ 5,9	13,5 $\pm$ 8,7
10 Monate/männlich/WT	11,5 $\pm$ 3,3	12,0 $\pm$ 4,1	13,3 $\pm$ 6,5	17,2 $\pm$ 10,1
10 Monate/männlich/C	21,1 $\pm$ 13,3	25,8 $\pm$ 13,2	22,4 $\pm$ 11,1	16,7 $\pm$ 15,1
10 Monate/weiblich/WT	15,0 $\pm$ 12,4	14,8 $\pm$ 11,4	17,4 $\pm$ 10,7	17,8 $\pm$ 16,0
10 Monate/weiblich/C	17,8 $\pm$ 6,5	18,3 $\pm$ 11,3	12,4 $\pm$ 6,0	12,0 $\pm$ 6,4
12 Monate/männlich/WT	12,9 $\pm$ 4,0	17,1 $\pm$ 4,5	17,4 $\pm$ 5,3	17,4 $\pm$ 6,2
12 Monate/männlich/C	27,8 $\pm$ 4,6	23,5 $\pm$ 9,4	16,6 $\pm$ 5,7	12,7 $\pm$ 4,4
12 Monate/weiblich/WT	9,0 $\pm$ 2,3	7,9 $\pm$ 3,0	9,6 $\pm$ 4,2	8,8 $\pm$ 3,1
12 Monate/weiblich/C	24,2 $\pm$ 20,7	25,4 $\pm$ 18,7	22,6 $\pm$ 19,8	30,7 $\pm$ 17,2
14 Monate/männlich/WT	15,1 $\pm$ 2,7	17,6 $\pm$ 7,5	18,4 $\pm$ 9,6	17,8 $\pm$ 9,4
14 Monate/männlich/C	19,5 $\pm$ 6,4	17,8 $\pm$ 6,4	15,5 $\pm$ 7,0	12,6 $\pm$ 4,9
14 Monate/weiblich/WT	19,8 $\pm$ 15,8	24,5 $\pm$ 18,6	28,3 $\pm$ 22,9	28,0 $\pm$ 17,7
14 Monate/weiblich/C	9,1 $\pm$ 2,4	14,2 $\pm$ 6,5	13,7 $\pm$ 7,5	10,9 $\pm$ 7,4
16 Monate/männlich/WT	14,7 $\pm$ 7,6	16,3 $\pm$ 8,3	15,7 $\pm$ 6,3	13,9 $\pm$ 6,3
16 Monate/männlich/C	13,8 $\pm$ 6,4	12,5 $\pm$ 5,4	12,8 $\pm$ 2,7	12,1 $\pm$ 5,5
16 Monate/weiblich/WT	14,7 $\pm$ 6,8	16,7 $\pm$ 9,7	18,9 $\pm$ 9,7	26,6 $\pm$ 11,0
16 Monate/weiblich/C	16,1 $\pm$ 10,4	16,8 $\pm$ 12,9	17,9 $\pm$ 15,2	19,2 $\pm$ 14,4

**Anzahl der Linienüberschreitungen pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW  $\pm$  SD)**

Es liegen keine signifikanten Haupteffekte oder Interaktionen vor (siehe Tabelle 23; auf eine graphische Darstellung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet).

## Time Food Intake

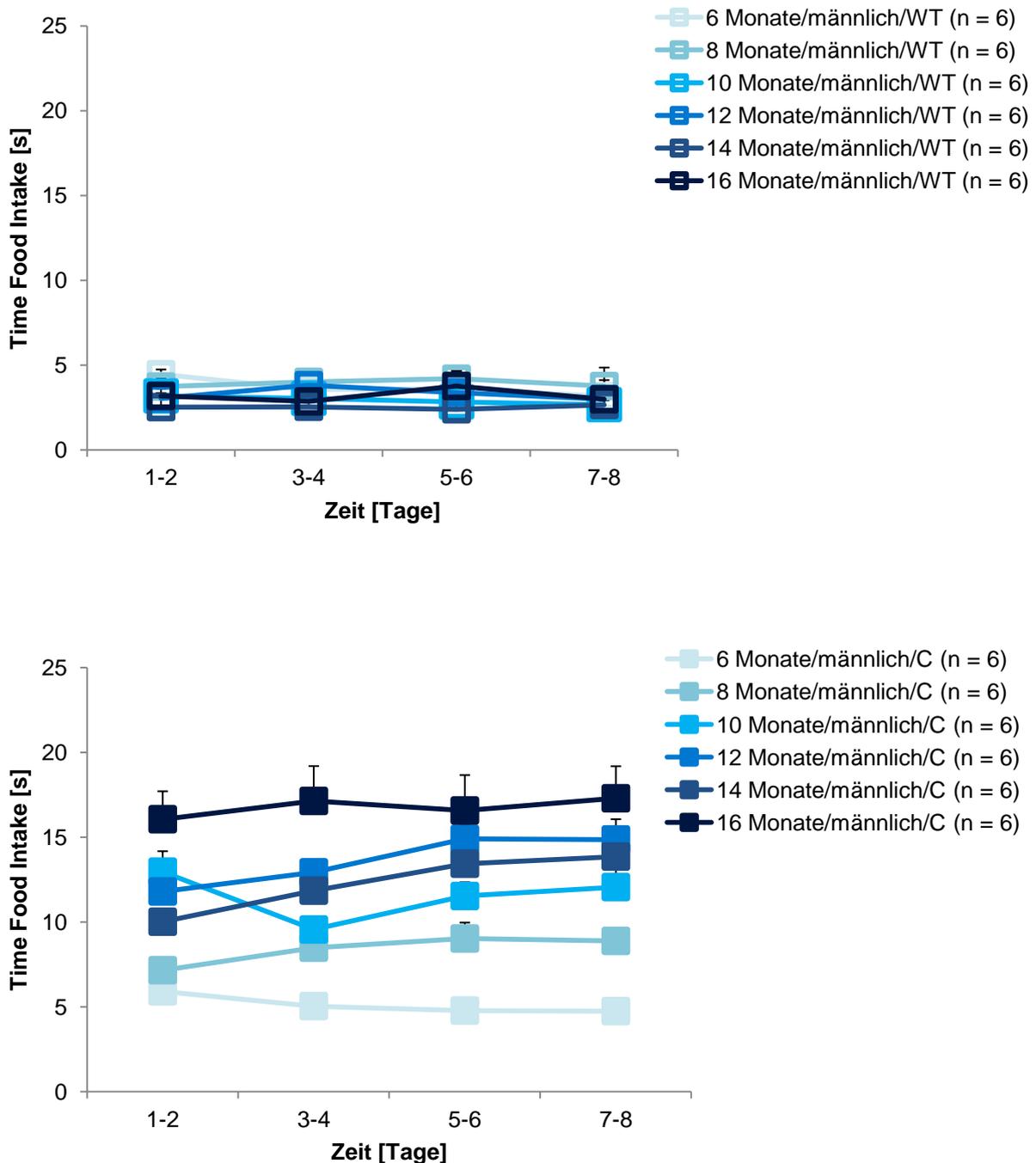
**Tabelle 24: Benötigte Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung aller 24 Gruppen im mHBT**

Gruppe	Tag 1-2	Tag 3-4	Tag 5-6	Tag 7-8
6 Monate/männlich/WT	4,5 ± 0,7	3,6 ± 0,4	3,6 ± 1,2	3,2 ± 0,8
6 Monate/männlich/C	5,9 ± 1,7	5,0 ± 1,3	4,8 ± 0,9	4,7 ± 0,9
6 Monate/weiblich/WT	4,3 ± 1,5	2,7 ± 0,5	2,3 ± 0,3	3,0 ± 0,7
6 Monate/weiblich/C	4,5 ± 0,8	5,8 ± 1,0	4,2 ± 0,8	4,2 ± 0,6
8 Monate/männlich/WT	4,2 ± 1,2	4,0 ± 1,1	4,2 ± 1,2	3,8 ± 0,9
8 Monate/männlich/C	7,2 ± 1,6	8,5 ± 1,6	9,0 ± 2,3	8,9 ± 1,5
8 Monate/weiblich/WT	3,4 ± 0,4	3,8 ± 0,5	3,0 ± 0,5	3,0 ± 0,9
8 Monate/weiblich/C	4,5 ± 1,5	3,8 ± 0,6	5,7 ± 1,7	5,7 ± 1,6
10 Monate/männlich/WT	3,3 ± 0,6	3,0 ± 0,3	2,8 ± 0,6	2,7 ± 0,6
10 Monate/männlich/C	13,0 ± 2,7	9,6 ± 1,7	11,5 ± 1,8	12,1 ± 3,0
10 Monate/weiblich/WT	3,6 ± 0,4	3,4 ± 0,7	3,6 ± 1,0	3,1 ± 0,5
10 Monate/weiblich/C	10,3 ± 3,1	8,9 ± 3,1	9,7 ± 2,9	13,0 ± 2,2
12 Monate/männlich/WT	3,2 ± 0,8	3,8 ± 0,6	3,4 ± 1,0	3,0 ± 0,6
12 Monate/männlich/C	11,8 ± 2,7	12,9 ± 1,5	14,9 ± 2,0	14,9 ± 1,4
12 Monate/weiblich/WT	3,2 ± 0,6	2,8 ± 0,8	3,0 ± 0,7	2,7 ± 0,5
12 Monate/weiblich/C	13,8 ± 4,6	13,5 ± 3,2	12,7 ± 4,8	12,0 ± 2,9
14 Monate/männlich/WT	2,5 ± 0,6	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,4	2,6 ± 0,4
14 Monate/männlich/C	10,0 ± 1,4	11,8 ± 3,7	13,4 ± 5,5	13,9 ± 5,4
14 Monate/weiblich/WT	4,5 ± 1,8	2,9 ± 0,9	2,6 ± 0,2	2,6 ± 0,6
14 Monate/weiblich/C	14,8 ± 4,3	13,9 ± 3,9	13,1 ± 5,6	11,7 ± 3,8
16 Monate/männlich/WT	3,2 ± 0,9	2,9 ± 0,7	3,8 ± 1,1	3,0 ± 0,5
16 Monate/männlich/C	16,1 ± 4,0	17,1 ± 5,0	16,6 ± 5,1	17,3 ± 4,6
16 Monate/weiblich/WT	2,9 ± 0,5	2,5 ± 0,8	2,8 ± 1,0	2,9 ± 0,6
16 Monate/weiblich/C	12,3 ± 4,1	14,9 ± 9,5	15,2 ± 7,9	17,7 ± 8,8

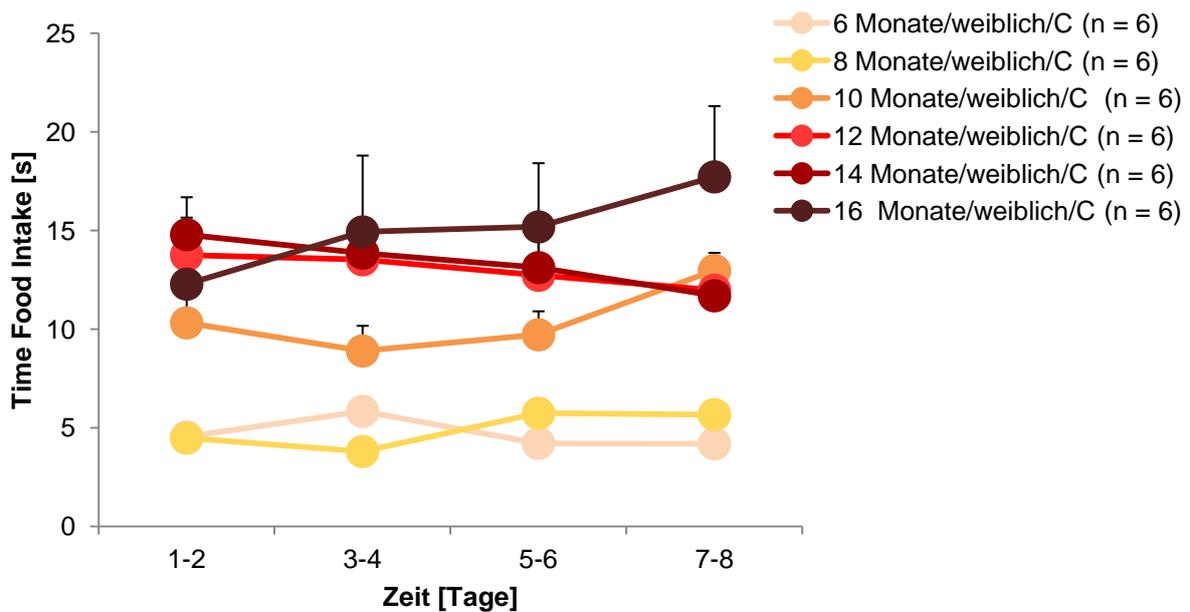
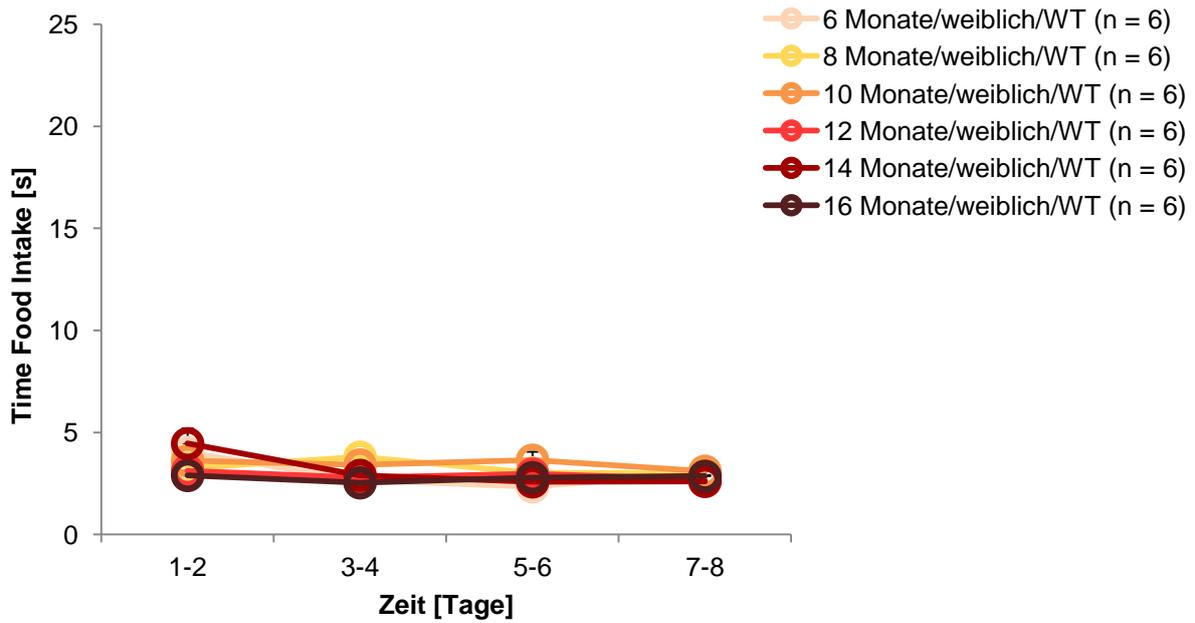
**Benötigte Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung in Sekunden (s) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller 24 Gruppen (je n = 6) im mHBT, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD)**

Generell benötigen die Carrier signifikant mehr Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung als die Wildtypen (Genotyp:  $p < 0,001$ ). Dabei ist die Auswirkung des Genotyps auf die Altersgruppen signifikant (Alter x Genotyp:  $p < 0,001$ ): Carrier weisen ab einem Alter von 10 Monaten eine längere Fressdauer auf als die gleichalten Wildtypen (jeweils  $p < 0,008$  (sig.)). Während bei den Wildtypen das Alter keine Rolle spielt (jeweils  $p > 0,002$  (n.s.)), kommt es bei den Carriern zu einer altersabhängigen Zunahme der Fressdauer (10 Monate vs. 6 Monate:  $p < 0,002$  (sig.); 10 Monate vs. 8 Monate:  $p = 0,007$  (n.s.)) (12 Monate vs. 6, 8 Monate:  $p <$

0,002 (sig.); 12 Monate vs. 10 Monate:  $p = 0,035$  (n.s.)) (14 Monate vs. 6, 8 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)) (16 Monate vs. 6, 8, 10 Monate:  $p < 0,002$  (sig.)). Im Alter von 12 bis 16 Monaten verändert sich die Fressdauer nicht mehr deutlich (jeweils  $p > 0,002$  (n.s.)). Hinsichtlich des Geschlechts treten keine signifikanten Unterschiede auf (Geschlecht:  $p > 0,05$ ) (siehe Tabelle 24 und Abbildung 30 und 31).



**Abbildung 30: Vergleichende graphische Darstellung (MW  $\pm$  SEM) der benötigten Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung (Time Food Intake) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**



**Abbildung 31: Vergleichende graphische Darstellung ( $MW \pm SEM$ ) der benötigten Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung (Time Food Intake) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT**

### 3.3.4 Western-Blot

Durch den Western-Blot wird semiquantitativ das Ausmaß der Expression spezifischer Rezeptoren im Hippokampus der Carrier und Wildtypen bestimmt: peripherer Benzodiazepin-Rezeptor (PBR), N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor mit NR2B-Untereinheit (NMDAR-NR2B) und metabotroper Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR5). Die gesuchten Proteine werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Bei der anschließenden Immundetektion wird eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert. Die über eine Dichtemessung bestimmte Schwärzungsintensität der Proteinbanden als Maß für die Chemilumineszenz korreliert mit der Rezeptorexpression. In die Analyse geht der Mittelwert nach jeweils zweimaliger Auswertung der Schwärzungsintensität ein. Als Bezugspunkt dient bei jedem Western-Blot die Schwärzungsintensität der Banden der Wildtypen, die auf den Wert 1 festgelegt wird. Die Werte der Carrier werden in Relation zu diesem Standard ermittelt (siehe Tabelle 29).

**Tabelle 25: Relative Schwärzungsintensität der Rezeptoren PBR, NMDAR-NR2B und mGluR5 im Hippokampus**

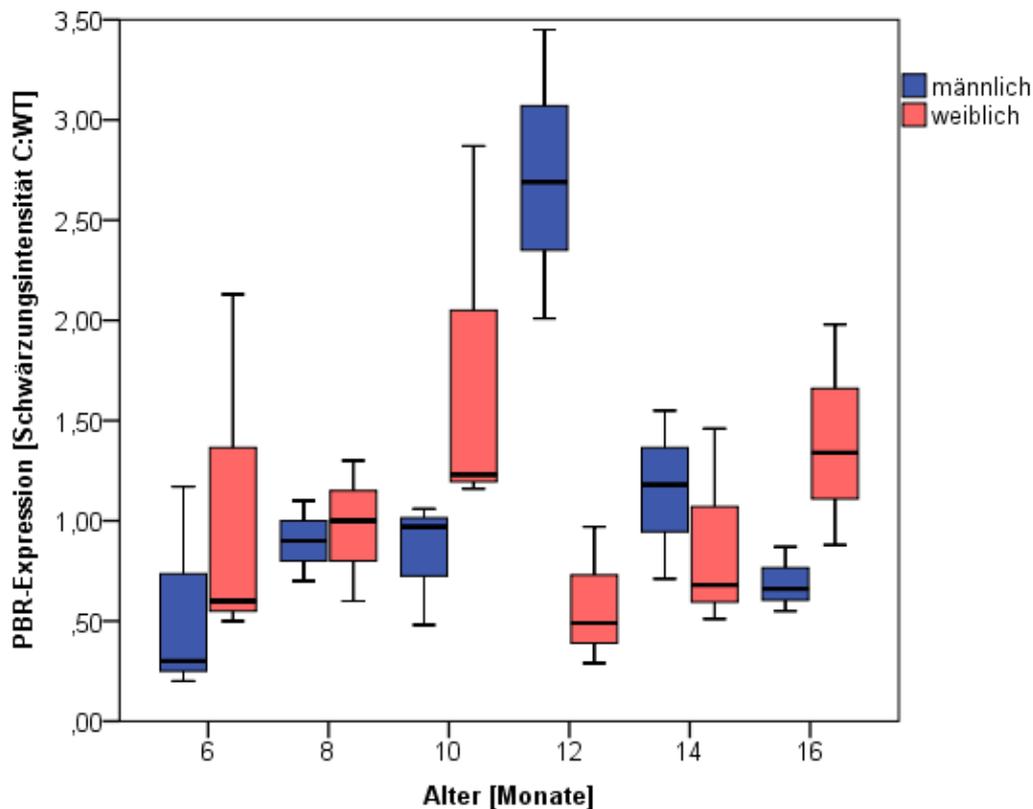
Gruppe	PBR	NMDAR-NR2B	mGluR5
6 Monate/männlich/C	0,55 ± 0,54	0,82 ± 0,30	1,09 ± 0,05
6 Monate/weiblich/C	1,08 ± 0,91	0,37 ± 0,1	0,89 ± 0,13
8 Monate/männlich/C	0,90 ± 0,22	0,61 ± 0,16	0,67 ± 0,19
8 Monate/weiblich/C	0,96 ± 0,33	2,19 ± 0,68	1,13 ± 0,14
10 Monate/männlich/C	0,84 ± 0,31	0,83 ± 0,21	1,06 ± 0,29
10 Monate/weiblich/C	1,75 ± 0,97	2,11 ± 1,19	1,39 ± 0,33
12 Monate/männlich/C	2,72 ± 0,72	1,32 ± 0,46	0,83 ± 0,21
12 Monate/weiblich/C	0,58 ± 0,35	1,68 ± 0,45	1,44 ± 0,02
14 Monate/männlich/C	1,14 ± 0,42	0,47 ± 0,49	0,99 ± 0,08
14 Monate/weiblich/C	0,88 ± 0,51	0,46 ± 0,23	1,19 ± 0,25
16 Monate/männlich/C	0,69 ± 0,16	0,63 ± 0,53	0,66 ± 0,17
16 Monate/weiblich/C	1,40 ± 0,55	1,44 ± 0,19	1,00 ± 0,10

*Relative Schwärzungsintensität der Rezeptoren PBR, NMDAR-NR2B und mGluR5 im Hippokampus der untersuchten Gruppen (je n = 3) im Western-Blot, angegeben als Mittelwert und Standardabweichung (MW ± SD) der Carrier (C) in Relation zu den Wildtypen (WT)*

#### 3.3.4.1 PBR-Expression

Die PBR-Expression erweist sich abhängig von der Interaktion zwischen Alter und Geschlecht (Alter x Geschlecht: p = 0,001). Bei den weiblichen Carriern zeigen sich keine signifikanten altersabhängigen Unterschiede. Dagegen ist die PBR-Expression bei den

männlichen Carriern im Alter von 12 Monaten höher als bei den männlichen Carriern der übrigen Altersgruppen (12 Monate vs. 6, 8, 10, 16 Monate:  $p < 0,002$  (sig.); 12 Monate vs. 14 Monate:  $p = 0,002$  (n.s.)). Im Alter von 12 Monaten ist die PBR-Expression der männlichen Carrier verglichen mit den gleichalten weiblichen Carriern ebenfalls signifikant höher ( $p < 0,008$  (sig.)) (siehe Tabelle 29 und Abbildung 32).

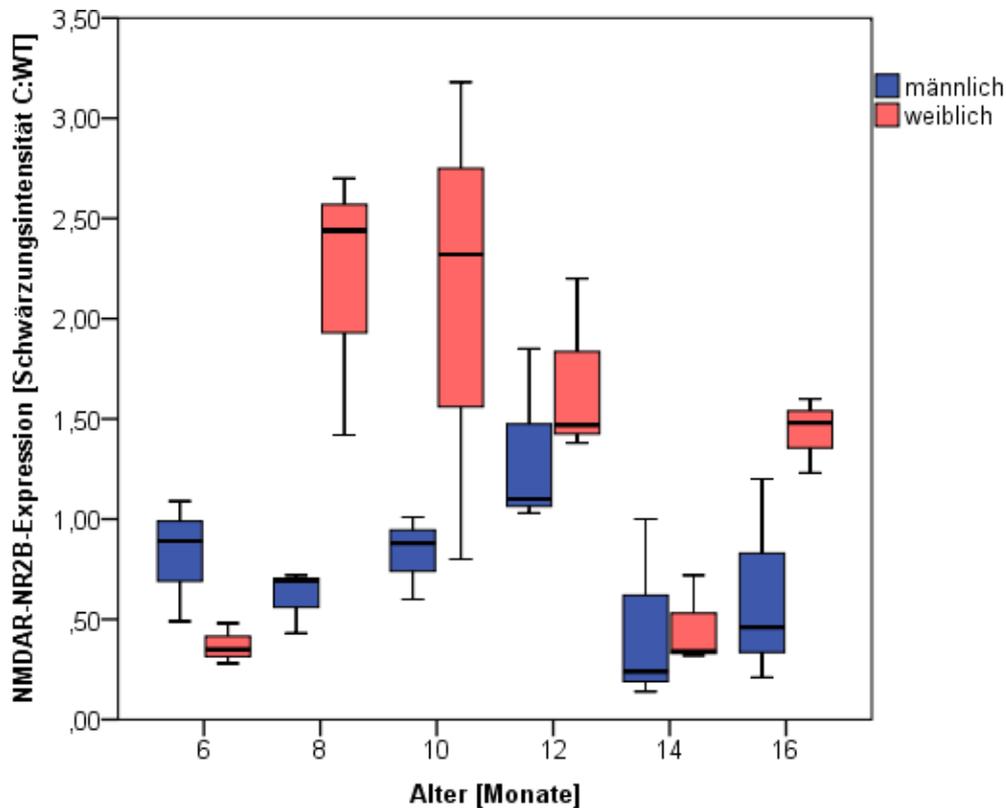


**Abbildung 32: Vergleichende graphische Darstellung (Median, 25 % und 75 % Perzentile) der Schwärzungsintensität des peripheren Benzodiazepin-Rezeptors (PBR) im Hippokampus der Carrier (C) in Relation zu den Wildtypen (WT) im Western-Blot**

### 3.3.4.2 NMDAR-NR2B-Expression

Die Interaktion zwischen Alter und Geschlecht übt einen signifikanten Effekt auf die NMDAR-NR2B-Expression aus (Alter x Geschlecht:  $p = 0,016$ ). Während sich die männlichen Carrier der verschiedenen Altersgruppen nicht unterscheiden, zeigen sich bei den weiblichen Carriern signifikante Differenzen. Die Rezeptorexpression ist bei den weiblichen Carriern im Alter von 8 und 10 Monaten höher als im Alter von 6 und 14 Monaten (jeweils  $p$

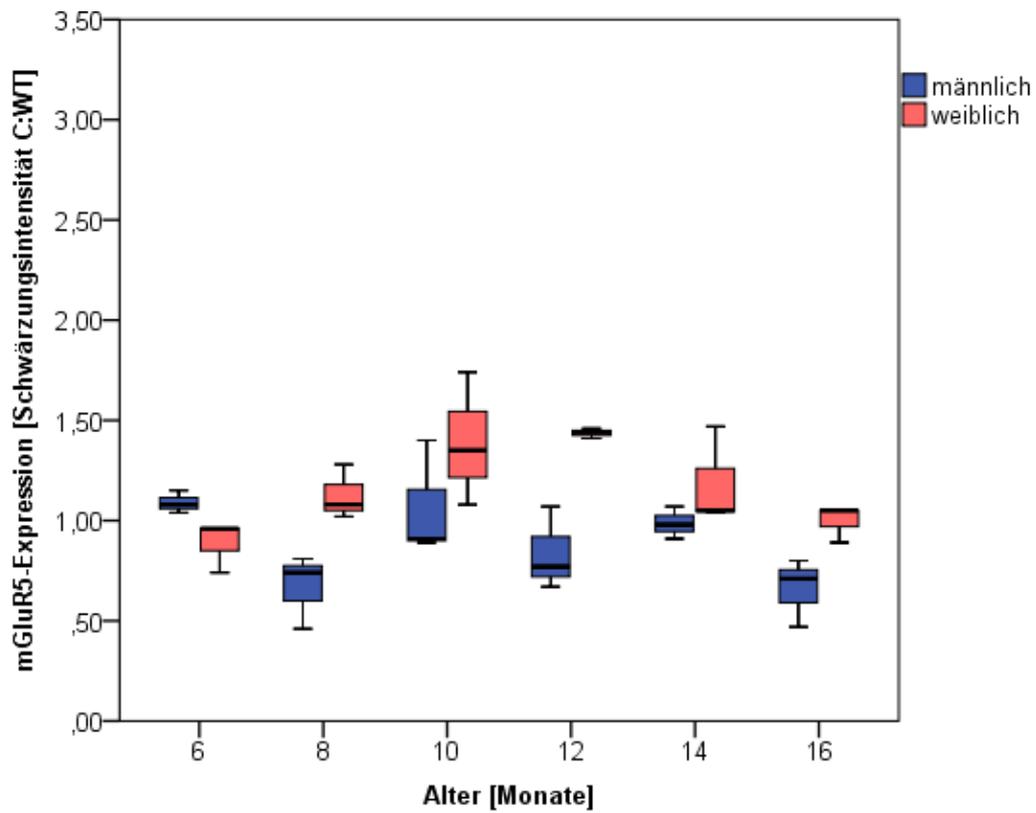
< 0,002 (sig.)). Beim Vergleich der 8 und 10 Monate alten weiblichen Carrier mit den gleichalten männlichen Carriern besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied (jeweils  $p < 0,008$  (sig.)) (siehe Tabelle 29 und Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Vergleichende graphische Darstellung (Median, 25 % und 75 % Perzentile) der Schwärzungsintensität des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors mit NR2B-Untereinheit (NMDAR-NR2B) im Hippokampus der Carrier (C) in Relation zu den Wildtypen (WT) im Western-Blot

### 3.3.4.3 mGluR5-Expression

Die männlichen Carrier weisen in den verschiedenen Altersgruppen keine Unterschiede in der mGluR5-Expression auf. Dagegen ist die mGluR5-Expression bei den weiblichen Carriern im Alter von 12 Monaten höher als im Alter von 6 Monaten (12 Mo vs. 6 Mo:  $p < 0,002$  (sig.)). Im Geschlechtervergleich ist die mGluR5-Expression bei den weiblichen Carriern im Alter von 8 und 12 Monaten höher als bei den gleichalten männlichen Carriern (jeweils  $p < 0,008$  (sig.)) (Alter x Geschlecht:  $p = 0,021$ ) (siehe Tabelle 29 und Abbildung 34).



**Abbildung 34: Vergleichende graphische Darstellung (Median, 25 % und 75 % Perzentile) der Schwärzungsintensität des metabotroper Glutamat-Rezeptors 5 (mGluR5) im Hippokampus der Carrier (C) in Relation zu den Wildtypen (WT) im Western-Blot**

## **4 Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1 Tg2576 als Tiermodell**

Aufgrund der globalen Verbreitung, der hohen Prävalenz und der gravierenden Bedeutung der Alzheimer-Krankheit (AK) für die Betroffenen, ihre Mitmenschen und die gesamte Wirtschaft haben die Entwicklung und stetige Verbesserung von Tiermodellen der AK einen hohen Stellenwert eingenommen.

Tiermodelle ermöglichen die Untersuchung von kognitiven Prozessen, Verhaltensausrägungen und deren Zusammenspiel. Ziel dabei ist es, Einblick in die der Krankheit zugrundeliegenden pathogenen Mechanismen zu erlangen und darauf basierend, erfolgreiche Therapiekonzepte für den Menschen zu konzipieren. Allerdings wird die Entwicklung von Tiermodellen für Erkrankungen des Menschen limitiert durch den Wissensstand über diese Krankheiten, so dass die Modelle häufig nur spezifische Aspekte statt eines umfassenden Bildes der Erkrankung wiederzugeben vermögen (VAN DER STAAY et al., 2009). Während im Rahmen der Erforschung der AK somit anfangs nur Modelle für isolierte Symptome zur Verfügung standen und schließlich auch die Überexpression des humanen Wildtyp-Amyloid-Vorläuferproteins (Wildtyp-APPs) in Mäusen nicht dem pathologischen Bild beim Menschen entsprach, war die Entdeckung der ursächlichen genetischen Mutationen der familiären AK ein wichtiger Schritt (ELDER et al., 2010). So konnten verschiedene transgene Mausmodelle entwickelt werden, die die menschlichen APP-Mutationen überexprimieren. Zwar kann keines dieser Modelle die AK des Menschen vollständig replizieren, doch leisten sie einen entscheidenden Beitrag für die Erforschung wichtiger Teilaspekte der AK. So konnten im Tiermodell zahlreiche wertvolle Kenntnisse über die Pathophysiologie der AK gewonnen werden, wie zum Beispiel über die möglicherweise entscheidende Beteiligung löslicher A $\beta$ -Oligomere (LESNE et al., 2006; TOMIC et al., 2009) und die zeitliche Folge kaskadenartig ablaufender pathogener Prozesse (LEWIS et al., 2001; SCHAEFFER et al., 2011). Zudem ist die Entwicklung und die präklinische Überprüfung von Therapiekonzepten, wie der aktiven oder passiven A $\beta$ -Immunisierung, erst durch die Nutzung transgener Mausmodelle möglich geworden (SCHENK et al., 1999; DODART et al., 2002; ELDER et al., 2010).

Die Untersuchung bestimmter Fragestellungen am Menschen ist aufgrund ethischer Überlegungen nicht möglich oder stark eingeschränkt. Hinzu kommt, dass klinische Studien schwer standardisierbar, sehr zeitaufwendig und nicht zuletzt kostenintensiv sind (GAMES et al., 2006). Mäuse hingegen können kontrolliert gezüchtet und einheitlich gehalten werden. Sie weisen eine hohe Reproduktionsrate auf und sind aufgrund ihrer Größe vergleichsweise einfach und kostengünstig unterzubringen. Mausmodelle sind daher gut geeignet, um Hypothesen erstmals in vivo zu testen und einen ersten Eindruck über die potentielle Effizienz therapeutischer Strategien zu gewinnen – zumindest im Rahmen des jeweiligen Modells.

Eine Übertragung gewonnener Erkenntnisse vom Nagetier auf den Menschen muss dabei allerdings kritisch hinterfragt werden. Zwar erscheint die Extrapolation kognitiver Vorgänge auf den Menschen durch die Verwendung geeigneter Testparadigmen durchaus möglich (D'MELLO und STECKLER, 1996), doch führen speziesspezifische anatomische und physiologische Eigenheiten zu zahlreichen Limitationen in der Beurteilung pathologischer und therapeutischer Ergebnisse (KOKJOHN und ROHER, 2009). So sollten Mausmodelle, die spezifische Mutationen tragen, die nach heutigem Wissensstand beim Menschen für das umfassende Krankheitsbild der AK verantwortlich sein können, lediglich als Modelle für Amyloidopathie und kognitive Defizite erachtet werden (HIGGINS und JACOBSEN, 2003). Neuronenverluste vergleichbaren Ausmaßes wie beim Menschen können nämlich genauso wenig festgestellt werden wie die für die AK charakteristischen neurofibrillären Bündel (NFTs). Als Gründe dafür werden unter anderem die kürzere Lebensspanne der Mäuse und speziesspezifische Unterschiede im Genexpressionsmuster, in der Sensitivität für die A $\beta$ -Toxizität und in den Eigenschaften des Tau-Proteins vermutet (KOKJOHN und ROHER, 2009; ELDER et al., 2010). Durch die Kombination mehrerer familiärer Alzheimer-Mutationen und Mutationen des Tau-Proteins wie bei der frontotemporalen Demenz des Menschen konnten Modelle wie das dreifach transgene Mausmodell von ODDO et al. (2003) kreiert werden, die ein breiteres Spektrum der für die AK typischen Pathologie aufweisen als einfach transgene Modelle. Dieses dreifach transgene Mausmodell entwickelt nicht nur A $\beta$ -Plaques und Langzeitpotenzierungs(LTP)-Defizite, sondern auch Läsionen ähnlich den NFTs (ODDO et al., 2003). Dabei muss jedoch angezweifelt werden, ob mehrfach transgene Tiere noch als Modelle für die AK anzusehen sind, repräsentieren sie doch eine Kombination unterschiedlicher Erkrankungen des Menschen, die natürlicherweise für gewöhnlich nicht gemeinsam auftreten (ELDER et al., 2010).

Für die vorliegende Studie fällt daher die Entscheidung für das transgene Tg2576-Mausmodell, das ein Gen für APP mit der schwedische Doppelmutation als Auslöser einer

familiären Form der AK des Menschen überexprimiert (HSIAO et al., 1996). Hierbei handelt es sich um ein vielversprechendes Tiermodell, das sich durch zahlreiche pathologische Veränderungen sowie durch altersabhängige kognitive Defizite und Verhaltensbeeinträchtigungen auszeichnet, die in vielerlei Hinsicht denen des Menschen ähneln (APELT und SCHLIEBS, 2001; KAWARABAYASHI et al., 2001; OGNIBENE et al., 2005; MIDDEI et al., 2006; MUSTAFIZ et al., 2011).

Zwar ist dieses Modell das meist beschriebene Mausmodell in der Erforschung der AK, doch existiert bisher keine geschlechtsbezogene Charakterisierung (GAMES et al., 2006; STEWART et al., 2011). Verschiedene Studien weisen lediglich auf einzelne Aspekte hin, die je nach Geschlecht unterschiedlich ausgeprägt scheinen (KING et al., 1999; CALLAHAN et al., 2001; MAYNARD et al., 2006; ALEXANDER et al., 2011). So ist z. B. die Menge an Plaques im Gehirn weiblicher Tg2576-Carrier ab einem Alter von 15 Monaten signifikant größer als bei männlichen Carriern (CALLAHAN et al., 2001). Zudem berichten KING et al. (1999) von geschlechtsabhängigen kognitiven Defiziten des Tg2576-Modells im Vergleich von drei und neun Monate alten Tieren. Aggressives Verhalten, wie es gehäuft bei Männern im Zusammenhang mit der AK beschrieben wird, kann auch verstärkt bei den männlichen Tg2576-Carriern im Alter von sieben Monaten im Vergleich zu den Wildtypen gezeigt werden (ALEXANDER et al., 2011). Somit scheint es für eine aussagekräftige, umfassende Charakterisierung des Phänotyps des Tg2576-Modells erforderlich, beide Geschlechter getrennt zu erfassen.

Die Entscheidung, in dieser Studie sowohl männliche als auch weibliche Tiere verschiedener Altersstufen gleichermaßen einer komplexen Untersuchung der Kognition, des Verhaltens sowie Laboranalysen zu unterziehen, ermöglicht einen umfassenden Vergleich der Geschlechter. Einerseits ist dies generell erforderlich, um die Validität eines Modells zu erhöhen (VAN DER STAAY et al., 2009), andererseits stellt es einen vorläufigen Ansatz dar, um die umstrittenen Geschlechterunterschiede bei der Ausprägung der AK im Modell zu betrachten. Die Interpretation der Ergebnisse wird allerdings durch die speziesspezifische Physiologie limitiert. So tritt die Menopause mit ihren hormonellen Veränderungen nur bei Frauen, nicht aber bei weiblichen Mäusen auf. Mäuse weisen im Alter geringer ausgeprägte Hormonschwankungen durch Unregelmäßigkeiten und Verlängerungen des Zyklus auf. Ein Zyklusstillstand schließlich tritt bei dem Mausstamm C57BL/6J, der auch am gemischten genetischen Hintergrund des Tg2576-Modells beteiligt ist, mit starken individuellen Unterschieden zwischen 11 und 16 Monaten auf (FELICIO et al., 1984). Über die reinen Hormonspiegel hinaus (VEST und PIKE, 2012) gibt es allerdings weitere Überlegungen zu

den Hintergründen der geschlechtsbezogenen Aspekte der AK. Dazu gehört u. a. eine höhere kognitive Reserve bei Männern (PERNECZKY et al., 2007) oder, wie im Mausmodell beobachtet werden konnte, eine geschlechtsabhängige Änderung der  $\beta$ -Sekretase (BACE)-Aktivität und der Metall-Ionen-Homöostase, die im Verdacht steht, die Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden beeinflussen zu können (SCHÄFER et al., 2007).

Eine Charakterisierung beider Geschlechter erscheint notwendig, um die geschlechtsbezogene Unterschiede der AK besser verstehen zu können und damit eine zusätzliche Grundlage für die Entwicklung und Prüfung spezifischer Therapiekonzepte zu schaffen.

#### **4.1.2 Modifizierter Hole-Board-Test**

Für die Ergebnisse der Phänotypisierung des Verhaltens von Mäusen ist nicht nur die Wahl des Mausmodells essentiell, sondern insbesondere auch die Entscheidung für ein geeignetes Testparadigma (OHL und KECK, 2003). In Anbetracht der Tatsache, dass die klinischen Symptome der AK des Menschen unter anderem auf einer Beeinträchtigung des Hippokampus beruhen, ist es offensichtlich, dass ein Verhaltenstest gewählt werden sollte, der u. a. eine Hippokampus-Schädigung zu repräsentieren vermag.

Als Goldstandard zur Untersuchung von Mausmodellen der AK gilt der Morris-Water-Maze-Test (MWM) (TANILA, 2012), der auf räumlichem Lernen basiert und somit geeignet ist, die Integrität des Hippokampus zu überprüfen (EICHENBAUM et al., 1990). Obgleich der MWM schon bei der Erstbeschreibung des Mausmodells Tg2576 zum Einsatz kam (HSIAO et al., 1996) und das am häufigsten genutzte Testparadigma zur Untersuchung kognitiver Defizite dieses Modells ist, so wirft er doch angesichts zahlreicher Nachteile die Frage auf, ob er wirklich der am besten geeignete Test für die Charakterisierung von Mausmodellen der AK ist (STEWART et al., 2011). Der MWM wurde ursprünglich für den Einsatz an Ratten entwickelt (MORRIS, 1984). Mäuse sind als streng terrestrische Tiere aber deutlich weniger an das Schwimmen adaptiert als Ratten. So kann der Test allein durch motorische Probleme bei der Fortbewegung und dem Erklimmen der Plattform im Wasser beeinflusst werden. Ein weiteres Problem ist das größere Oberflächen-Körpervolumen-Verhältnis und das geringer ausgebildete Unterhautfettgewebe bei Mäusen, was sie durch den wiederholten Aufenthalt im Wasser anfällig für eine Hypothermie macht. Die Erhöhung der Wassertemperatur und der Aufenthalt unter einer Wärmelampe zwischen einzelnen Testdurchgängen wirken einer Unterkühlung der Mäuse entgegen. Diese Vorgehensweise führt allerdings zu einer zeitlichen Verzögerung gegenüber klassischen Versuchsprotokollen, so dass die Sensitivität des MWM

bezüglich der räumlichen Gedächtnisfunktion vermindert wird (TANILA, 2012). Zudem ist bei Mäusen ein anderes Suchverhalten als bei Ratten feststellbar, da sie nach einmaliger erfolgloser Suche der Plattform häufig nicht länger im vermuteten Bereich kreisend schwimmen, sondern sich vielmehr zurück zum Ausgangspunkt bewegen. Dies erschwert die Interpretation klassischer kognitiver Parameter, die im MWM erhoben werden, wie der Aufenthaltsdauer im korrekten Quadranten (TANILA, 2012). Dazu kommt, dass die primäre Motivation im MWM negativ ist, nämlich die Flucht vor der lebensbedrohlichen Situation im Wasser. Dies ist bei Mäusen mit einem besonders hohen Stressniveau verbunden, belegt durch deren hohen Kortikosteron-Gehalt im Blut nach Durchführung dieses Verhaltenstests (HARRISON et al., 2009). Stress wiederum beeinflusst die kognitiven Ergebnisse (DE QUERVAIN et al., 2009). Daher sind nach Möglichkeit Testparadigmen zu bevorzugen, die auf positiver Motivation beruhen und damit stressarm sind.

Generell sollten Verhaltenstests an die spezifischen Fähigkeiten der jeweiligen Versuchstiere angepasst sein, um diese adäquat beurteilen zu können (D'MELLO und STECKLER, 1996). Während im Vergleich eines Mausmodells mit einem Rattenmodell im MWM die kognitive Leistungsfähigkeit von Mäusen geringer zu sein scheint, sind bei einem Labyrinth im Trockenen keine Unterschiede feststellbar (WHISHAW und TOMIE, 1996). Die insgesamt geringe Leistungsfähigkeit von Mäusen beim Verhaltenstest im Wasser mag ein Grund dafür sein, dass nicht alle Forschungsgruppen im MWM kognitive Defizite bei Mausmodellen der AK gegenüber gesunden Kontrollmäusen feststellen konnten (STEWART et al., 2011).

In Anbetracht der Forderungen nach einem Verhaltenstest, der die physiologischen und ethologischen Eigenheiten der Mäuse berücksichtigt, den Tieren einen positiven Anreiz bietet und möglichst sensitiv bei der Feststellung typischer krankheitsspezifischer Defizite ist, fällt die Wahl im Rahmen dieser Studie auf den modifizierten Hole-Board-Test (mHBT).

Der mHBT bietet den Vorteil eines komplexen Verhaltenstests, der multidimensionale ethologische Beobachtungen ermöglicht, was angesichts des vielfältigen Verhaltensrepertoires von Nagetieren von großer Bedeutung ist. Bei den klassischen Verhaltenstests für kognitive Defizite wie dem MWM und T-Labyrinth werden nur wenige, definierte Parameter untersucht, häufig durch computergestützt automatisierte, festgelegte Messungen. Auf diese Weise können unerwartete und subtile Verhaltensänderungen übersehen werden. Dagegen erweist sich der mHBT als sehr sensitive Methode, um auch dezente Verhaltensauffälligkeiten durch einen trainierten Beobachter erfassen zu können (OHL und KECK, 2003). Um eine Vielzahl unterschiedlicher Parameter in einem Tiermodell zu untersuchen, wird üblicherweise auf eine ganze Batterie von Verhaltenstests

zurückgegriffen. Wird dafür immer dieselbe Versuchskohorte genutzt, kann dies zu Interferenzen und einer Beeinflussung nachfolgender Versuchsergebnisse führen und somit auch einer Vergleichbarkeit mit anderen Studien im Weg stehen (STEWART et al., 2011) (OHL und KECK, 2003). Wird für jeden Test eine eigene Versuchskohorte genutzt, führt dies zu einer höheren Gesamtzahl an für die Untersuchung benötigten Tieren. Dies ist aus Tierschutzgründen abzulehnen. Zusätzlich entsteht ein höherer Zeit- und Kostenaufwand (OHL et al., 2001). Dies kann durch die Nutzung des mHBTs umgangen werden. Der mHBT erlaubt es, gleichzeitig eine Vielzahl von Parametern der Kognition und des Verhaltens zu untersuchen. Somit wird die Forderung von STEWART et al. (2011) erfüllt, bei der Charakterisierung des Tg2576-Modells auch potentiell vorhandene Defizite nicht-kognitiver Art zu erfassen. Die Erhebung verschiedener Parameter bietet ferner den Vorteil, dass vorhandene Wechselwirkungen untereinander leichter aufgedeckt werden können. So gehen Modelle kognitiver Defizite des Öfteren mit nicht-kognitiven Beeinträchtigungen einher, die ihrerseits die kognitive Leistung beeinflussen können. Brauchen Tiere länger, um eine Aufgabe zu bewältigen, kann dies außer an Gedächtnisschwierigkeiten beispielsweise auch an verstärkter Angst, verringerter Motivation oder an motorischen Problemen liegen (STEWART et al., 2011).

Im mHBT können die Versuchstiere ohne Zwang ihren natürlichen Verhaltensweisen nachgehen und werden durch attraktive Futterbelohnungen positiv bei der Nahrungssuche motiviert. Während zahlreiche Verhaltenstests auf vorherigen Futter- oder Wasserentzug als Verstärkung der Motivation zurückgreifen, sind diese Stressfaktoren beim mHBT nicht notwendig. Da Nagetiere in neuer Umgebung allerdings nur zögerlich unbekanntes Futter aufnehmen, wird sichergestellt, dass die Tiere bereits Tage zuvor an die Mandeln als Futterbelohnung im mHBT gewöhnt werden (OHL, 2003). Dadurch dass der Verhaltenstest in demselben Raum stattfindet, in dem die Tiere auch gehalten werden, entfallen zusätzliche Belastungen wie Transport der Tiere oder Änderung klimatischer Einflüsse. Außerdem wird eine störungsfreie, konstante Testsituation erzeugt, indem die Mäuse stets von derselben Person betreut und untersucht werden. Zudem wird auf eine geräuscharme Tastatur für die Dateneingabe während des mHBTs zurückgegriffen. Durch diese Maßnahmen wird versucht, das Stressniveau für die Tiere niedrig zu halten, um die kognitiven Parameter möglichst wenig zu verfälschen.

Von Vorteil ist weiterhin, dass in der eigenen Arbeitsgruppe bereits auf jahrelange Erfahrung in der Durchführung des mHBTs zurückblickt werden kann. So konnten beispielsweise

GORDAN et al. (2012) die Sensitivität des mHBTs im Vergleich zum MWM in einem zerebralen Ischämie-Modell bei Ratten bestätigen.

Zusammenfassend stellt der mHBT also eine sinnvolle Alternative zu den üblichen Verhaltenstests dar, die im Rahmen phänotypischer Charakterisierungen von Mausmodellen Anwendung finden.

#### **4.1.3 Western-Blot-Verfahren**

Wie von STEWART et al. (2011) betont, sollte eine sensitive Phänotypisierung eines Mausmodells idealerweise über reine Verhaltenstests hinausgehen. Im Zuge dessen werden die Mäuse dieser Studie am Tag nach Beendigung des mHBTs getötet und die Gehirne entnommen, um laboranalytische Untersuchungen durchzuführen. Hierfür wird das Western-Blot-Verfahren als relativ einfache Methode zur Proteinanalyse genutzt, das sich seit seiner Beschreibung in der biochemischen und medizinischen Forschung und Diagnostik als allgegenwärtiges, vielseitiges und spezifisches Werkzeug etablieren konnte (TOWBIN et al., 1979; BURNETTE, 1981; KURIEN und SCOFIELD, 2003).

Die Proteinexpressionsuntersuchung dieser Studie setzt sich aus mehreren gekoppelten Schritten zusammen, der Zellyse, der Proteinkonzentrationsbestimmung, der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine, dem eigentlichen Western-Blot, bei dem die Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden, und der Immundetektion dieser Proteine. Aufgrund des umfangreichen Protokolls einer Einzelanalyse mit einer zweitägigen Dauer obliegt die exakte Durchführung immer derselben geschulten Person zur Vermeidung potentieller Fehlerquellen in den einzelnen Schritten.

Das Aufschließen der Zellen wird durch manuelle Zerkleinerung des Probengewebes sowie Mazeration in wässrigem Lyse-Puffer sichergestellt. Um die Verdauung der Proteine durch freigesetzte zelluläre Proteasen zu verhindern, werden Inhibitoren zugegeben, ausschließlich vorgekühlte Reagenzien verwendet und es wird ständig über Wassereis gearbeitet. Die gelösten Proteine können in einer ebenfalls gekühlten Zentrifuge von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt werden. Es wird eine photometrische Bestimmung der im Zellysat vorhandenen Proteinkonzentration vorgenommen, um daraus das für die Elektrophorese zu verwendende Probenvolumen ermitteln zu können. Die einheitlich festgelegte Proteinmenge von 25 µg pro Geltasche stellt die Vergleichbarkeit der verschiedenen Gehirnproben untereinander sicher und verhindert gleichzeitig einen zu geringen Probenauftrag, der unter die Nachweisgrenze des Verfahrens fallen könnte.

Zur Auftrennung der Proteine wird die Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) genutzt, die gegenüber anderen elektrophoretischen Verfahren einige Vorteile bietet. Durch Erhitzung der Proben und Zugabe von Reduktionsmittel und dem Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden Quartär- und Tertiärstrukturen der Proteine gelöst und Ladungsunterschiede aufgehoben. Alle Proteine liegen als negativ geladene, gestreckte Polypeptidketten vor, deren Auftrennung im elektrischen Feld somit nur mehr vom Molekulargewicht abhängt. Im Gegensatz dazu können bei einer nativen, nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verschmierte Banden auftreten, wenn vorhandene Oligomere bei der Wanderung dissoziieren. Das angewandte Verfahren nach LAEMMLI (1970) beruht zusätzlich auf der Diskontinuität der Gelstruktur. Die Proben bewegen sich zunächst durch das grobporige Sammelgel, in dem aus dem Laufpuffer eindringende Glyzinionen wegen des neutralen pH-Werts als Zwitterionen vorliegen. Die negativ geladenen Proben ordnen sich zwischen den langsam wandernden Glyzinionen und den schneller wandernden Chloridionen an. Durch den entstehenden Spannungsgradienten schließen sie zu den Leitungen auf und sammeln sich dort an. Durch dieses sog. „diskontinuierliche Verfahren“ wird eine hohe Trennschärfe erreicht. Erst im Trenngel bewegen sich die Proteine mit einer von ihrer Größe abhängigen Geschwindigkeit Richtung Anode. Dieser Siebeffekt wird selektiv genutzt, indem der Vernetzungsgrad der Gelmatrix an die Molekülgröße des gesuchten Proteins angepasst wird. Ein Gel mit hohem Polyacrylamidanteil ist engmaschiger und somit für die Auftrennung kleinerer Proteine geeignet. Es ist auf darauf zu achten, die Gele luftblasenfrei zu gießen, um eine gleichmäßige Wanderung der Proben zu gewährleisten.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgt das eigentliche „Blotting“. Hierbei werden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen. Die Membran ist leicht zu handhaben und für weitere biochemische Methoden zugänglich. Die Proteine werden durch chemische Wechselwirkungen an die Trägermatrix gebunden und immobilisiert, wobei das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster nach der Übertragung auf die Membran erhalten bleibt. Im Gegensatz zum Gel laufen somit bei der Membran Reaktionen und Waschvorgänge unbehindert von störenden Diffusionsvorgängen zügig ab (TOWBIN et al., 1979). Wichtig ist ein rascher und möglichst vollständiger Proteintransfer (KURIEN und SCOFIELD, 2003). Auch hier gilt, die Schichtung aus Gel, Membran und Filterpapieren luftblasen- und faltenfrei anzulegen, um Artefakte und falsche Ergebnisse zu vermeiden. Nitrozellulose als Membran ist ein gut geeignetes Trägermaterial, das sich durch eine relativ hohe Proteinbindungskapazität auszeichnet. Als Übertragungsart wird das sog. „Nassblotting“ gewählt. Dabei wird zwar im Vergleich zum halbtrockenen Verfahren eine größere Menge an

Puffer verbraucht, dafür beugt die Kühlung des Gesamtsystems aber einer zu starken Erwärmung des Gels während der elektrophoretischen Übertragung vor. So lässt sich ein mögliches Verwischen der Banden verhindern. Zur optischen Kontrolle einer gelungenen Auftrennung und eines gelungenen Transfers dient der farbige Molekülgrößenstandard, der bereits bei der elektrophoretischen Auftrennung mitläuft und später, nach Entwicklung des Blots, der Identifikation der Bande des gesuchten Proteins dient.

Um ein möglichst spezifisches Ergebnis zu erreichen, werden die unbesetzten Bindungsstellen der Membran mit fettarmer Milchpulverlösung gesättigt. Zusätzlich wird bei der Proteindetektion darauf geachtet, überschüssige Antikörper durch Waschschriffe sorgfältig zu entfernen. Die Immundetektion erfolgt zur Signalverstärkung durch das indirekte Verfahren über einen primären Antikörper, der das Zielprotein auf der Membran erkennt, und einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper. Die hierbei genutzte Chemilumineszenz-Detektion ist eine leicht standardisierbare, sensitive, selektive und einfache Methode zur Visualisierung der Antikörperbindung (KURIEN und SCOFIELD, 2003). Wichtig ist, die Inkubationszeiten laut Protokoll einzuhalten und auf eine vollständige Durchfeuchtung der Membran mit den jeweiligen Reagenzien auf dem Schüttler zu achten.

Bei routinierter Durchführung und Vermeidung von Fehlerquellen stellt das Western-Blot-Verfahren eine elementare, hoch spezifische Methode zur Identifikation und zum semiquantitativen Vergleich von Proteinen in unterschiedlichen Zellysatproben dar, zu der es bislang keine vergleichbare Alternative gibt.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Mortalität

In der vorliegenden Studie ergibt sich im Rahmen der Zucht des Tg2576-Mausmodells ein Verhältnis der geborenen Wildtypen zu den geborenen Carriern entsprechend der Mendelschen Regeln von etwa 1:1. Somit liegt keine unterschiedliche pränatale Mortalität zwischen den Genotypen vor. Dagegen ist die postnatale Mortalität des Tg2576-Mausmodells bei den Trägern des Transgens signifikant höher als bei den Wildtypen, was auf dem verstärkten Verlust von Carriern in den ersten 12 Lebensmonaten beruht. Dieser altersabhängige Effekt deckt sich mit den Sterberaten von Tg2576-Carriern in den Studien von KING und ARENDASH (2002) und KING et al. (1999). Verfrühtes, plötzliches Versterben ist allgemein ein häufig beschriebenes Phänomen des Tg2576-Modells sowie anderer transgener Mausmodelle der Alzheimer-Krankheit (AK). Übereinstimmend mit der vorliegenden Studie wurde auch in einem Mausmodell der AK von MANSO et al. (2012) beobachtet, dass die Mortalität bei den männlichen Carriern höher ist als bei den weiblichen Carriern. Dieses Mausmodell beruht ebenfalls auf dem Tg2576-Modell, weist aber durch eine zusätzliche Kreuzung einen modifizierten genetischen Hintergrund auf. Die Ursache der geschlechtsspezifischen Ausprägung der Mortalität ist nicht bekannt. Eine Überlegung dazu betrifft die neuroprotektive Wirkung des Hormons Östrogen bei weiblichen Tieren (VEST und PIKE, 2012) in der kritischen Phase des Überlebens in den ersten 12 Lebensmonaten. Aber auch die Mechanismen, die generell der hohen Sterblichkeit der transgenen Mausmodelle der AK zugrunde liegen, sind nicht genau erforscht. Ein möglicher Grund kann in universellen Mechanismen, wie einer chromosomalen Instabilität nach dem Einbringen humaner Gene in das murine Genom (KING und ARENDASH, 2002), vermutet werden. Einen besonderen Einfluss scheint daneben der genetische Hintergrund des Tiermodells zu haben. So konnte ein Mausmodell aufgrund der exzessiven Todesrate nicht auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes FVB/N etabliert werden, obwohl dasselbe genetische Konstrukt wie beim Tg2576-Modell verwendet wurde (HSIAO et al., 1995; HSIAO et al., 1996). Zudem liegt der Verdacht nahe, dass die aus der Überexpression des menschlichen Amyloid-Vorläuferproteins (APP) resultierenden A $\beta$ -Peptide die Überlebensfähigkeit der Mäuse beeinträchtigen. Während die plötzlichen Todesfälle schon zu Zeitpunkten auftreten, in denen noch keine Plaques im Gehirn der Tg2576-Mäuse nachweisbar sind (CALLAHAN et al., 2001; KAWARABAYASHI et al., 2001), könnten bereits lösliche A $\beta$ -Peptide toxische Wirkungen entfalten. Dabei spielt vermutlich die

Entstehung schädigend wirkender reaktiver Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle. Dies wird durch Studien unterstützt, in denen die antioxidativ wirkende Superoxid-Dismutase die Mortalität transgener Mausmodelle der AK verringert. Die Superoxid-Dismutase schützt dabei besonders Endothelien und damit die zerebrale Mikrozirkulation vor Schädigung (CARLSON et al., 1997; IADECOLA et al., 1999). Des Weiteren schließen WESTMARK et al. (2008) aus ihren Studienergebnissen, dass eine höhere Anfallsneigung, wie sie auch bei menschlichen Alzheimer-Patienten beschrieben ist, zur erhöhten Mortalität der Tg2576-Carrier im Vergleich zu den Wildtypen beitragen kann. Die in der vorliegenden Studie erhöhte Todesrate innerhalb des ersten Monats nach dem Transport in die neue Umgebung des Tierhaltungsraums deutet zusätzlich auf eine hohe Stressanfälligkeit der Carrier des Tg2576-Mausmodells hin.

Ein pathologisches Phänomen, das bei einem Viertel aller männlichen Carrier im Rahmen dieser Studie beobachtet werden kann, ist das Auftreten eines Penisprolaps. Dies wurde bislang, soweit die Literaturrecherche ergab, noch in keiner anderen Studie des Tg2576-Modells beschrieben. Durch die Beobachtung, dass ein erlittener Penisprolaps die Todesrate männlicher Tiere nicht erhöht, lassen sich körperliche Schwäche und beeinträchtigtes Allgemeinbefinden als Ursachen ausschließen, da diese ein vorzeitiges Versterben der Mäuse mutmaßlich begünstigt hätten. In einer Studie von SEO et al. (2010) wurden im Tg2576-Modell erstmals Neurodegeneration, oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion im Rückenmark sowie eine Demyelinisierung von Nervenfasern nachgewiesen. Diese pathologischen Merkmale wurden in Zusammenhang mit den beobachteten Defiziten im Bewegungsverhalten gebracht. Eine generalisierte periphere Neurodegeneration könnte über die Beeinträchtigung der parasymphischen Neuronen des Ganglion pelvicum die Innervation des Penis stören und so einen Prolaps bedingen. Eine zusätzliche neurophysiologische Herangehensweise und histologische Aufarbeitung dieses Phänomens sollte in Folgestudien erfolgen.

#### **4.2.2 Physiologische Parameter**

Über die Dauer des modifizierten Hole-Board-Tests ist bei sämtlichen Tieren eine Gewichtsreduktion bei weiterhin ungestörtem Allgemeinbefinden zu verzeichnen. Dies wird vermutlich bedingt durch den erhöhten Kalorienverbrauch aufgrund des größeren Bewegungsfreiraums in der Versuchsarena.

Übereinstimmend mit der vorliegenden Studie wiesen auch bei MANSO et al. (2012) die Mäuse, die die schwedische Doppelmutation der familiären AK exprimieren, ein geringeres Körpergewicht als die Wildtypen auf. Dabei handelt es sich um ein häufig beschriebenes Phänomen transgener Mausmodelle der AK. Wie an einer Studie mit C57BL/6-Mäusen aufgezeigt, scheint allerdings die alleinige Durchführung gentechnischer Methoden das Körpergewicht der Tiere nicht zu beeinflussen. Vielmehr erweist sich das Körpergewicht abhängig von der Funktionalität des Genkonstrukts (VAN DER MEER et al., 2001). Daher lässt sich vermuten, dass die beobachtete Gewichtsreduktion bei Mausmodellen der AK eine Folge der APP-Überexpression ist. In einer longitudinalen Studie des APP23-Mausmodells, das das humane APP751 mit der schwedischen Doppelmutation unter Kontrolle des Thy-1-Promotors überexprimiert, wurde eine erhöhte Futteraufnahme der Carrier im Vergleich zu den Wildtypen bei gleichzeitigem Gewichtsverlust verzeichnet. Während die Wildtypen und Carrier im Absatzalter von 4 Wochen noch gleich schwer waren, war bereits mit 4,5 Wochen ein signifikanter Unterschied feststellbar. Die Autoren schließen dabei auf das Auftreten eines hypermetabolen Stoffwechselzustands der Carrier (VLOEBERGHIS et al., 2008), wie es teilweise auch bei Alzheimer-Patienten in klinischen Studien vermutet wird (WANG, P. N. et al., 2004). Zudem können die im Tg2576-Modell beschriebenen Störungen von Schlaf und zirkadianem Rhythmus (WISOR et al., 2005) sowie eine gesteigerte lokomotorische Aktivität im Käfig bei der Gewichtsentwicklung eine Rolle spielen (OGNIBENE et al., 2005). Im vorliegenden Studiendesign wird dies nicht näher untersucht. Der genaue Grund für das geringere Gewicht von Tg2576-Carriern bleibt weiter abzuklären.

Insgesamt weisen männliche Tiere erwartungsgemäß signifikant höhere Konzentrationen des männlichen Geschlechtshormons Testosteron im Serum auf als weibliche Tiere. Entsprechend sind die Östradiol-Werte bei den weiblichen Tieren insgesamt höher als bei den männlichen Tieren. Eine detaillierte altersabhängige Auswertung dieser Daten ist nicht möglich, da zahlreiche Werte unterhalb der Nachweisgrenze des zur Hormonbestimmung durchgeführten Elektrochemilumineszenz-Immunoassays liegen und so nicht eingehend verglichen werden können. Eine weitere Einschränkung stellt die Verwendung zyklischer Mäuse dar. Der Zyklus einer weiblichen Maus dauert im Durchschnitt 4 bis 5 Tage (FELICIO et al., 1984). Die Tiere gehen ohne Kontrolle ihres Zyklusstadiums in den Verhaltenstest ein. Dies hat Schwankungen der Östradiolwerte im Serum zwischen den gleichalten Tieren bei Versuchsende zur Folge. Eine genaue Untersuchung auf altersabhängige Änderungen des Hormonspiegels, zum Beispiel eine beginnende Azyklizität im Alter von 11 bis 16 Monaten wie von FELICIO et al.

(1984) an C57BL/6J-Mäusen beobachtet, ist daher nicht möglich. Da in der vorliegenden Studie geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Kognition und dem Verhalten der Tg2576-Mäuse festgestellt werden, erscheint es sinnvoll, in zukünftigen Studien das jeweilige Zyklusstadium der Tiere durch adspektorische und zellzytologische Untersuchungen zu erfassen (BYERS et al., 2012). Durch die Verwendung von Tieren im gleichen Zyklusstadium könnten weiterführende Erkenntnisse über den spezifischen Hormoneinfluss gewonnen werden.

Eine mögliche Limitation der vorliegenden Studie ist die Verwendung von vier Carriern im Verhaltenstest, die homozygote Träger eines Gendefekts für Retinadegeneration sind. Der genetische Hintergrundstamm SJL ist bekannt für die rezessive Vererbung der rd1-Mutation des Gens für die  $\beta$ -Untereinheit der Stäbchen-Phosphodiesterase 6 (Pde6brd1). Pde6brd1-Homozygotie führt zu Degeneration der Stäbchen in der Retina, so dass bei den betroffenen Tieren ab einem Alter von sieben Wochen starke Sehstörungen angenommen werden. Als dämmerungs- und nachtaktive Tiere haben Mäuse jedoch einen hoch entwickelten Gehör-, Geruchs- und Tastsinn. So können sie beispielsweise allein über ihre Tasthaare Objekte spezifisch wiedererkennen (YASSINE et al., 2013).

Eine aktuelle Studie zeigt, dass Pde6b<sup>rd1</sup>-homozygote Mäuse nicht in der Lage sind, den Morris-Water-Maze-Test (MWM) zu erlernen. Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Ergebnisse im sog. „Barnes-Maze-Test“, die sich als gänzlich unabhängig vom Pde6b<sup>rd1</sup>-Status der Tg2576-Carrier und Wildtypen erweisen. Hierbei handelt es sich um einen räumlich-kognitiven Verhaltenstest, bei dem die Mäuse aus einer Vielzahl kreisförmig angeordneter Löcher die Position des Fluchtlochs zu ihrem Käfig erlernen sollen. Dabei zeigt sich, dass weder die kognitive Leistungsfähigkeit noch die Wahl der Suchstrategie durch das Sehvermögen der Tiere beeinflusst wird (YASSINE et al., 2013). Tatsächlich feuern nachweislich die Ortszellen im Hippokampus von blinden Nagern ebenso wie von Nichtblinden (SAVE et al., 1998). Die Erstellung einer kognitiven Landkarte zur räumlichen Orientierung scheint also nicht zwingend auf visuellen Reizen zu basieren, sondern vielmehr ein Ergebnis der Gesamtheit aller wahrgenommenen sensorischen Reize zu sein. Während die gewonnenen propriozeptiven Informationen beim Schwimmen für blinde Mäuse im MWM nicht ausreichen, um zu einer allozentrischen Repräsentation der Umwelt zu führen, handelt es sich beim Barnes-Maze-Test um ein Labyrinth auf festem Boden. Dadurch können die Mäuse rascher navigieren und sich anhand der verschiedenen sensorischen Reize im Raum

und an den Löchern in der Versuchsarena erfolgreich räumlich orientieren (YASSINE et al., 2013).

Wie auch in der Studie von YASSINE et al. (2013) stehen den Tieren der vorliegenden Studie vielfältige sensorische Reize zur allgemeinen Orientierung zur Verfügung. Da die Versuche immer an derselben Position im Haltungsraum der Tiere durchgeführt werden, sind stets gleichbleibende auditive und olfaktorische Sinneseindrücke gegeben. So können immer auf derselben Raumseite die restlichen untergebrachten Mäuse, auf der anderen Seite der Computer und der vor dem modifizierten Hole-Board-Test (mHBT) stehende Untersucher wahrgenommen werden. Des Weiteren sind im mHBT die drei Zylinder, die mit Futterbelohnungen bestückt werden, durch weiße Klebstreifen markiert. Diese Markierung ist für die Mäuse vielfältig sensorisch wahrnehmbar und soll mit der Belohnung assoziiert werden. Neben der visuellen Markierung durch die weiße Farbe auf dem grauen Zylinder ist eine olfaktorische Markierung durch den Klebstoff sowie eine taktile Markierung durch die Kante des Bandes gegeben. Da die prinzipielle Versuchsdurchführung des Barnes-Maze-Tests der des mHBTs ähnelt, wird zusammenfassend angenommen, dass der  $Pde6b^{rd1}$ -Status der Mäuse keinen entscheidenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse nimmt.

### **4.2.3 Kognition**

Das Hauptaugenmerk dieser Studie liegt in der geschlechtsabhängigen Charakterisierung des Tg2576-Mausmodells im Alter von 6 bis 16 Monaten bezüglich Kognition, Verhalten und motorischen Parametern im modifizierten Hole-Board-Test (mHBT). Das Prinzip des mHBTs besteht darin, dass die Mäuse lernen, markierte Zylinder mit Futterbelohnungen zu assoziieren und sich die räumliche Anordnung derselben über die Durchläufe pro Tag zu merken. Das dafür notwendige bewusste Erinnern und Verknüpfen von Fakten und Ereignissen ist die Aufgabe des deklarativen Gedächtnisses. Bei der Verarbeitung dieser kontextabhängigen, räumlichen Informationen nimmt der Hippokampus als Teil des limbischen Systems im medialen Temporallappen eine wichtige Rolle ein (EICHENBAUM et al., 1990; SQUIRE und ZOLA, 1996; BUCHNER, 2006; BIRBAUMER und SCHMIDT, 2010). Somit ermöglicht der mHBT, u. a. Beeinträchtigungen des Hippokampus zu untersuchen (OHL und FUCHS, 1999; VAN DER STAAY et al., 2012). Dadurch, dass die Verteilung der markierten Zylinder jeden Tag variiert, sollen dagegen einfache prozedurale Lernstrategien des nicht-deklarativen Gedächtnisses durch motorische Automatisierung verhindert werden (SQUIRE und ZOLA, 1996). Zur Erlangung einer möglichst effizienten Strategie zur Nahrungssuche müssen sich die Tiere innerhalb eines Durchlaufs erinnern, welche der Futterbelohnungen sie bereits

gefressen haben, um so unnötige wiederholte Lochbesuche zu vermeiden (VAN DER STAAY et al., 2012). Die Überprüfung dieser kurzfristigen Informationsspeicherung und -bearbeitung räumlicher und zeitlicher Art ermöglicht die Untersuchung des Arbeitsgedächtnisses mit dem präfrontalen Kortex als sein neuronales Korrelat (OHL und FUCHS, 1999; BADDELEY, 2003; OHL et al., 2003).

Es zeigt sich, dass sämtliche Gruppen im Mittel weniger als die maximale Zeit von fünf Minuten in der Versuchsarena verbringen, also den mHBT durch das Auffinden aller drei Futterbelohnungen vorzeitig abschließen. Damit übereinstimmend wird auch die maximal mögliche Anzahl ausgelassener Belohnungen von allen Gruppen unterschritten. Nicht nur alle Wildtypen, sondern auch alle Träger des Transgens sind damit unabhängig von Alter und Geschlecht in der Lage, den Verhaltenstest zu absolvieren. Daneben stellt sich bei allen Gruppen auch ein Lern- und Habituationseffekt ein. Die Tiere lernen, dass auf dem Board Futter zu finden ist, und verlassen es daher zwischen dem Suchen und Fressen der Belohnungen weniger oft. Während also die Anzahl der Board-Besuche im Laufe der acht Versuchstage abnimmt, steigt die auf dem Board verbrachte Zeit. Dort kommt es zur Abnahme der Anzahl der besuchten nicht markierten Zylinder. Des Weiteren folgt eine fortschreitende Verminderung der pro Durchlauf benötigten Zeit. Gemeinsam mit einer Verringerung der ungerichteten explorativen Tätigkeit, gekennzeichnet durch das Erheben auf die Hinterbeine, verdeutlichen diese Beobachtungen die Zunahme einer gerichteten Nahrungssuche auf dem Board im Laufe der Versuchstage. Die Fähigkeit zum Lernen ist also, wie schon bei der Erstbeschreibung des verwendeten Mausmodells (HSIAO et al., 1996), bei Wildtypen und Carriern in sämtlichen untersuchten Altersstufen weiterhin gegeben.

Bei männlichen und weiblichen Wildtypen fallen in dem eingesetzten Testparadigma gleichermaßen wenige Fehler durch falsch oder wiederholt besuchte Löcher an. Zudem sind bei den Wildtypen bis zum untersuchten Alter von 16 Monaten keine Defizite der untersuchten Gedächtnissysteme durch einen kognitiven Abbau feststellbar. Dagegen kann bei den Carriern eine altersabhängige Beeinträchtigung des deklarativen Gedächtnisses und damit der Hippokampus-Funktion verzeichnet werden. So erweist sich die Anzahl falsch besuchter Löcher ab einem Alter von 8 bis 10 Monaten gegenüber den Wildtypen erhöht und steigt in den höheren Altersstufen weiter an. Dieses Ergebnis deckt sich mit zahlreichen Studien, die ebenfalls Hippokampus- und altersabhängige kognitive Defizite im Tg2576-Mausmodell beschreiben (HSIAO et al., 1996; CORCORAN et al., 2002; WESTERMAN et al., 2002; OGNIBENE et al., 2005; CACUCCI et al., 2008). Dabei wird das Einsetzen der

Beeinträchtigungen in unterschiedlichem Alter verzeichnet. So berichten HSIAO et al. (1996) übereinstimmend mit der vorliegenden Studie von den ersten signifikanten Defiziten bei 9 bis 10 Monate alten Tieren im Morris-Water-Maze-Test (MWM), WESTERMAN et al. (2002) dagegen schon in einem Alter von 6 Monaten. Dem stehen Studien gegenüber, die im Tg2576-Modell kaum oder gar keine abnehmende Gedächtnisleistung der Carrier mit steigendem Alter verzeichnen können. So stellen KING und ARENDASH (2002) bei ihrer Charakterisierung des Modells im Alter von 3 bis 19 Monaten in einer aufeinanderfolgenden Serie von Verhaltenstests keine progressiven kognitiven Einbußen der Carrier gegenüber den Kontrolltieren fest. DEACON et al. (2008) finden nur in einem einzigen kognitiven Testparadigma einer umfangreichen Testbatterie altersabhängige Defizite. Daher halten die Autoren das Tg2576-Mausmodell für kein zufriedenstellendes, zuverlässiges Modell für die Alzheimer-Forschung, insbesondere auch aufgrund des niedrig ausfallenden Leistungsniveaus der Kontrolltiere. Jedoch berichten dieselben Autoren ein Jahr später korrigierend, in einer Folgestudie bei den inzwischen 22 Monate alten Tieren unter Verwendung modifizierter Versuchsprotokolle doch deutliche kognitive Defizite gefunden zu haben (DEACON et al., 2009). Mögliche Ursachen für diskrepante Ergebnisse zu der vorliegenden Studie und zwischen verschiedenen Laboren werden am Ende des Kapitels besprochen.

Die in dieser Studie aufgezeigte signifikante Beeinträchtigung der deklarativen Gedächtnisleistung von Tg2576-Carriern lässt vermuten, dass eine Schädigung des Hippokampus vorliegt. Diese kann zu Schwierigkeiten bei der räumlichen Orientierung sowie zu Problemen beim Erlernen der Verknüpfung zwischen Zylindermarkierung und Belohnung führen. Die Funktionalität des Hippokampus soll es ermöglichen, eine Art kognitive Landkarte der Umwelt anzulegen (O'KEEFE, 1976) und somit eine allozentrische Repräsentation der Umgebung als Überblickswissen zu bieten, die das zielgerichtete Aufsuchen der Standorte markierter Zylinder in den Folgedurchläufen ermöglicht. Die Wildtypen orientieren sich räumlich in der Versuchsarena und können dadurch markierte Zylinder direkt ansteuern, sobald sie das Prinzip des mHBTs und die jeweilige Lokalisation der Belohnungen in den Folgedurchläufen erlernt haben. Dementsprechend schlägt sich dies in einer geringen Fehler- und Auslassungszahl bei den Zylinderbesuchen nieder. Tg2576-Carrier scheinen dazu nicht im selben Maß in der Lage zu sein. So kann bei den Carriern im Sinne einer nicht-räumlichen Suchstrategie gehäuft beobachtet werden, dass sie nach Betreten des Boards der Reihe nach ohne Zögern sämtliche Zylinder nach Futter absuchen, unabhängig von Markierung oder Standort. Dieses systematische Durchsuchen der Umgebung unter gleichförmigen Bewegungssequenzen erweist sich als weniger effizient, da durch die

zahlreichen Lochbesuche unnötige Energie verbraucht wird. Letztlich führt diese Strategie aber ebenfalls Auffinden der Nahrung, also zum Erfolg. Das nicht-selektive Suchen der Carrier manifestiert sich in der hohen Anzahl falsch, wiederholt und richtig besuchter Zylinder. In ähnlicher Weise navigieren auch im MWM TgCRND8-Mäuse, die die Gene zweier verschiedener familiärer APP-Mutationen exprimieren. Sie schwimmen systematisch alle möglichen Plattformpositionen kreisförmig ab, anstatt sich wie die Kontrolltiere gezielt an optischen Hinweisen im Raum zu orientieren (JANUS, 2004). In der Anwendung alternativer, nicht-räumlicher Suchstrategien begründet sich also, wieso auch Tiere mit hippokampaler Beeinträchtigung bestimmte räumliche Verhaltenstests absolvieren können. Die vermuteten Probleme bei der Organisation einer kognitiven Landkarte werden unterstrichen durch die altersabhängig eingeschränkte Fähigkeit von Tg2576-Carriern, zu erkennen, dass Objekte im Raum verschoben sind (OGNIBENE et al., 2005; MIDDEI et al., 2006). Daraus resultiert die Neigung, Aufgaben bevorzugt durch prozedurale, motorische Strategien zu absolvieren. Tatsächlich konnte nur in alten, nicht aber in jungen Tg2576-Carriern eine verminderte Aktivität der Ortszellen im Hippokampus festgestellt werden (CACUCCI et al., 2008). In ganz ähnlicher Weise scheint die visuell-räumliche Orientierungsfähigkeit auch bei Alzheimer-Patienten beeinträchtigt zu sein (MONACELLI et al., 2003).

Ob die beobachtbaren kognitiven Defizite im Tg2576-Modell auf der Anreicherung von A $\beta$ -Peptiden und deren Konsequenzen beruhen oder lediglich eine Folge der artifiziellen Überproduktion des APPs sind, zeigt die Studie von OHNO et al. (2004) auf. Dabei kann eine kognitive Verschlechterung bei Tg2576-Mäusen verhindert werden, wenn die  $\beta$ -Sekretase 1 (BACE1) zur Umsetzung des APPs ausgeschaltet wird. Daher scheint die bloße APP-Überexpression keinen wesentlichen Einfluss zu haben.

Auch das räumliche Arbeitsgedächtnis erweist sich in der vorliegenden Studie nur bei den Carriern altersabhängig beeinträchtigt. Erste Defizite können bereits im Alter von 8 Monaten beobachtet werden und verstärken sich mit 10 Monaten. Im Alter von 12 bis 16 Monaten sind die Beeinträchtigungen noch deutlicher ausgeprägt als bei den jüngeren Tieren. Die betroffenen Mäuse scheinen sich häufig nicht mehr erinnern zu können, dass sie die Belohnung aus einem markierten Zylinders im entsprechenden Durchlauf bereits gefressen haben. Dieser signifikante Anstieg der Wiederholungsfehler lässt neben räumlichen Orientierungsschwierigkeiten auch auf eine altersabhängige Schädigung des präfrontalen Kortex schließen. Übereinstimmend weist die schlechte Performance älterer Tg2576-Carrier im T-Labyrinth mit erzwungener Alternation (CHAPMAN, P. F. et al., 1999) und im Y-

Labyrinth (OGNIBENE et al., 2005) ebenfalls auf Defizite des räumlichen Arbeitsgedächtnisses und damit des präfrontalen Kortex hin. Eine gestörte Funktion des präfrontalen Kortex ist auch bei menschlichen Alzheimer-Patienten bekannt. Vielfach kann bereits in frühen dementiellen Stadien eine damit einhergehende Reduktion der Aufmerksamkeit, z. B. bei speziellen Kartensortieraufgaben, nachgewiesen werden (HODGES, J. R., 2006).

Im direkten Vergleich der Geschlechter erweist sich sowohl das deklarative Gedächtnis als auch das Arbeitsgedächtnis bei den weiblichen Carriern stärker beeinträchtigt als bei den männlichen Carriern. Diese Resultate könnten für die Hypothese sprechen, dass sich die AK bei gleichem Ausmaß pathologischer Veränderungen bei Frauen klinisch stärker ausprägt als bei Männern (BARNES et al., 2005). Andererseits könnte der Geschlechterdimorphismus im Mausmodell auch darauf begründet sein, dass das Gehirn weiblicher Tiere für pathologische Manifestationen anfälliger ist, möglicherweise aufgrund hormoneller Differenzen (CARROLL et al., 2010). So weisen in einer Studie von CALLAHAN et al. (2001) weibliche Tg2576-Carrier mit 15 Monaten signifikant mehr A $\beta$ -Plaques im Gehirn auf als männliche Carrier. Eine stärkere Beeinträchtigung weiblicher Carrier in bestimmten kognitiven Verhaltenstests und Altersstufen wird auch von KING et al. (1999) festgestellt, wohingegen CORCORAN et al. (2002) keine sexuellen Differenzen verzeichnen. Im dreifach transgenen Mausmodell von ODDO et al. (2003) wiederum erweist sich die Leistung des Arbeitsgedächtnisses von 12 bis 14 Monate alten weiblichen Carriern signifikant schlechter als die von männlichen Carriern (CARROLL et al., 2010). Ein umfassender Vergleich der vorliegenden geschlechtsabhängigen Ergebnisse der Tg2576-Carrier im mHBT mit Angaben in der Literatur ist allerdings nicht möglich, da Studien zur Charakterisierung des Tg2576-Modells überwiegend auf eine Unterscheidung der Geschlechter verzichten (STEWART et al., 2011).

#### **4.2.4 Verhalten**

Es muss bedacht werden, dass Kognition und Verhalten unmittelbar miteinander verknüpft sind und sich wechselseitig beeinflussen (STEWART et al., 2011). Dies kann begründen, warum sich die beobachteten kognitiven Defizite nach erstmaligem Auftreten nicht in allen folgenden Altersstufen weiter progressiv verschlechtern. So scheinen 12 Monate alte Carrier, besonders weibliche, schon in gleichem Maße bzw. tendenziell sogar stärker beeinträchtigt zu sein als die älteren Carrier. Die hohe Zahl falsch und wiederholt besuchter Löcher im Alter von 12 Monaten wird allerdings dadurch beeinflusst, dass die weiblichen Carrier mit 12

Monaten eine Phase besonders hoher Aktivität aufweisen und dadurch insgesamt mehr Löcher besuchen. In diesem Alter tendieren weibliche Carrier zu einer höheren lokomotorischen Aktivität als die weiblichen Wildtypen. Die 12 Monate alten weiblichen Carrier betreten nicht nur das Board häufiger im Vergleich zu den anderen Altersstufen, sondern weisen zudem eine hohe gerichtete explorative Tätigkeit auf, wie das häufige Ansteuern korrekter Löcher zeigt.

Im Allgemeinen kann in dieser Studie im mHBT beobachtet werden, dass sich die Carrier besonders ab einem Alter von 10 Monaten deutlich länger auf dem Board aufhalten, es häufiger betreten und sich kürzere Zeit putzen als die Wildtypen. Natürlicherweise geraten Nagetiere aber, wenn sie mit einer neuen Umgebung konfrontiert werden, in einen Konflikt zwischen Vermeidung potentieller Gefahren und ihrem angeborenen Erkundungsdrang (OHL, 2003). Dadurch zeigen sie eine gewisse Erregungs- und Angstsymptomatik wie häufiges Putzen und vermehrter Aufenthalt in den peripheren und damit eher geschützten Bereichen eines offenen Feldes. Somit schränkt Angst das Verweilen auf dem zentral gelegenen Board und damit das intensive Erkundungsverhalten im mHBT ein. Diese natürliche Verhaltensinhibition scheint allerdings bei den Carriern im Alter reduziert zu sein. Ohne deutlich durch Angst eingeschränkt zu sein, widmen diese Tiere sich ausgiebig der Futtersuche auf dem Board und schließen die Durchläufe trotz zahlreicher falscher Zylinderbesuche sogar in kürzerer Zeit ab als die Wildtypen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Studien von OGNIBENE et al. (2005) und LALONDE et al. (2003), bei denen die Gruppen älterer Tg2576-Carrier ebenfalls ein reduziertes Angstverhalten und eine erhöhte explorative Aktivität zeigen, weshalb die Autoren auf disinhibitorische Verhaltenstendenzen schließen. Eine Studie von ADRIANI et al. (2006) zeigt, dass Tg2576-Carrier zu erhöhter motorischer Impulsivität neigen. Diese Tiere konnten sich gegenüber den Wildtypen signifikant weniger gedulden, auf zeitlich verzögerte Futterbelohnungsgaben zu warten. Enthemmes, unruhiges und hyperaktives Verhalten wird auch bei einem Teil der menschlichen Alzheimer-Patienten beobachtet (AALTEN et al., 2007).

Des Weiteren sind in der vorliegenden Studie die Ergebnisse der 6 und 8 Monate alten weiblichen Tiere auffällig. Verglichen mit den älteren weiblichen Tieren und den männlichen Tieren halten sich diese kürzere Zeit auf dem Board auf. Auch betreten die 6 Monate alten weiblichen Tiere das Board mit größerer zeitlicher Verzögerung, erstarren häufiger unbeweglich an Ort und Stelle und lassen deutlich mehr Futterbelohnungen aus. Dementsprechend benötigen die weiblichen Tiere insgesamt länger zum Beenden der Testdurchläufe. Diese Ergebnisse spiegeln ein hohes Maß an Ängstlichkeit und ein dadurch gehemmes Verhalten wider. In ähnlicher Weise kann in der Studie von CLINTON et al.

(2007) im dreifach transgenen Mausmodell der AK nur an weiblichen Carrier im Alter von 6 und 9 Monaten ein deutlicher Leistungseinbruch im MWM gezeigt werden. Dies wird durch eine nachgewiesenen überproportional hohe Kortikosteron-Ausschüttung als Stressantwort der jungen weiblichen Carrier bedingt. Andererseits könnte es sein, dass junge Carrier, vergleichbar dem Menschen, die ersten Anzeichen ihrer nachlassenden kognitiven Leistungsfähigkeit spüren und möglicherweise ebenfalls mit verringerter Motivation, mit Depression und Furcht auf diese Veränderung reagieren (MAIER et al., 2010). Diese Theorie kann allerdings nicht das gehemmte Verhalten der 6 und 8 Monate alten weiblichen Wildtypen in der vorliegenden Studie erklären. Der zugrundeliegende geschlechtsspezifische Mechanismus bedarf somit der weiteren Abklärung.

#### **4.2.5 Bewegungsverhalten**

Während die Carrier insgesamt eine höhere explorative Aktivität als die Wildtypen zeigen, ungehemmt zahlreiche Löcher nach Futter absuchen und dadurch vermehrt Gelegenheit zu Fehlern haben, ist die Neigung zum Männchen machen, mithin zu ungerichteter Exploration, geringer ausgeprägt als bei den Wildtypen. Es kann vermutet werden, dass die Carrier aufgrund der mutmaßlich gestörten räumlichen Orientierungsfähigkeit auf das allgemeine Auskundschaften und Überblicken der Umgebung verzichten, sondern sich vielmehr direkt der einfachen nicht-räumlichen Suchstrategie zuwenden. Eine andere Theorie beinhaltet das Auftreten von Defiziten in der Motilität, durch die sich die Tiere beim Erheben auf die Hinterbeine unsicher fühlen und es aus diesem Grund häufiger unterlassen. Einen Hinweis darauf liefert die Studie von SEO et al. (2010), bei der die Carrier des Tg2576-Modells überraschenderweise im Rückenmark und Nervus ischiadicus ausgeprägte degenerative Veränderungen aufweisen und demzufolge ein verändertes Gangbild und beeinträchtigte Reflexe der Hinterhand zeigen. Zudem beschreiben KING und ARENDASH (2002), dass Carrier weniger lange die Balance auf einem schmalen Balken halten können als Wildtypen. Störungen des Bewegungsverhaltens und der Koordination sind auch bei Menschen mit Alzheimer-Krankheit zu beobachten und werden bei diesen vermutlich durch Veränderungen im extrapyramidalen System hervorgerufen (SCARMEAS et al., 2004).

Insgesamt ist in der hier vorliegenden Studie die Motilität der Mäuse auch in fortgeschrittenem Alter nicht so stark eingeschränkt, als dass der Verhaltenstest nicht mehr absolviert werden könnte. Eine Reduktion der lokomotorischen Tätigkeit ist ebenfalls nicht zu verzeichnen. Diffizilere Beeinträchtigungen der Bewegungsfähigkeit können allerdings durch die Beurteilung der Feinmotorik festgestellt werden. Hierbei können mit dieser Studie

erstmalig signifikante, mit dem Alter progressiv fortschreitende Schwierigkeiten der Carrier beim Fressen von kleinen Futterstücken beschrieben werden. Dazu ist ein hohes Maß an Geschicklichkeit und koordinativer Fähigkeiten der Tiere von Nöten. Das Mandelstückchen muss in den Pfoten gehalten, dem Maul zugeführt und gekaut werden. Im Vergleich zu den Wildtypen benötigen die Carrier im mHBT ab einem Alter von 10 Monaten mehr Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung. Bei den Wildtypen sind dagegen keine altersabhängigen feinmotorischen Defizite festzustellen. Feinmotorische Störungen können auch bei Alzheimer-Patienten auftreten und zeigen sich beispielsweise in Unregelmäßigkeiten im Schriftbild (SCHRÖTER et al., 2003). Obwohl die Carrier eine längere Zeit zum Fressen brauchen, liegt die benötigte Gesamtzeit pro Durchlauf bei den Carriern aufgrund deren enthemmten Verhaltens insgesamt unter der der Wildtypen.

Die Gründe für diverse Diskrepanzen zwischen den Studienergebnissen einzelner Forschungsgruppen sind vermutlich vielfältig. So kann schon das Durchlaufen einer Verhaltensbatterie durch dieselbe Versuchskohorte zu einer nachfolgenden Beeinflussung der Ergebnisse führen (OHL und KECK, 2003). Auch sind die verschiedenen Verhaltenstests jeweils unterschiedlich gut für die Untersuchung bestimmter Gedächtnissysteme und Verhaltensparameter geeignet (HODGES, H., 1996) und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität. So zeigen STEWART et al. (2011) in einer Übersichtsarbeit auf, dass der MWM – obwohl es sich um einen der am häufigsten eingesetzten Testparadigmen in der präklinischen Demenzforschung handelt – nicht der sensitivste Verhaltenstest zur Aufdeckung kognitiver Defizite transgener Modelle der AK ist. Des Weiteren nehmen die je nach Labor unterschiedlichen Versuchsprotokolle, Methoden, Haltungs- und Umweltbedingungen Einfluss auf die Ergebnisse (WESTERMAN et al., 2002; KOBAYASHI und CHEN, 2005). Je nach Art des Verhaltenstests kann aber auch die häufig fehlende Untersuchung auf die vererbte Retinadegeneration des SJL-Mausstammes aufgrund einer möglichen Visusbeeinträchtigung Auswirkungen haben (YASSINE et al., 2013). Zudem liegt der Verdacht nahe, dass das Auftreten von Unterschieden im hybriden genetischen Hintergrundstamm von Mausmodellen eine Rolle spielt, da derselbe starken Einfluss auf den Phänotyp eines Mausmodells haben kann (HSIAO et al., 1996; KOBAYASHI und CHEN, 2005; DEACON et al., 2008). Dies verdeutlicht insgesamt die Wichtigkeit, ein Mausmodell zunächst im eigenen Labor zu etablieren, bevor spezifischere Untersuchungen durchgeführt werden, um eine gesicherte Vergleichbarkeit der Ergebnisse anhand eigener Daten zu gewährleisten.

#### 4.2.6 PBR-, NMDAR-NR2B- und mGluR5-Expression

A $\beta$ -Peptide stehen im Verdacht, die synaptische Plastizität bestimmter Hirnareale zu verändern und so die schwerwiegende Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit bei Alzheimer-Patienten zu verursachen (RENNER et al., 2010). Da sowohl beim Menschen als auch beim Tg2576-Mausmodell im Rahmen der AK Defizite des räumlichen Gedächtnisses festgestellt werden können, wird in der vorliegenden Studie der Fokus auf die Untersuchung von Rezeptoren im Hippokampus gesetzt. Das glutamaterge System spielt eine entscheidende Rolle bei der für die Gedächtnisfunktion wichtigen Regulation der Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression (REVETT et al., 2012). So liegt bei Alzheimer-Patienten eine signifikant geringere mRNA-Synthese der NR2A- und NR2B-Untereinheiten des glutamatergen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDAR) vor. Dieser Unterschied bestätigt sich durch die Bestimmung der Proteinexpressionslevel und kann nur in den auch für Neurodegeneration anfälligen Gehirnregionen wie dem Hippokampus festgestellt werden. Dies könnte eine der möglichen Ursachen der bei Alzheimer-Patienten beobachteten Beeinträchtigung der Lern- und Gedächtnisleistung sein. Andere NR2-Isoformen scheinen dagegen generell unbeeinflusst zu sein (HYND et al., 2004). Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu den vorliegenden Untersuchungsergebnissen des Western-Blots beim Tg2576-Modell. Da bekannt ist, dass die NMDAR-NR2B-Expression bei Nagetieren mit zunehmendem Alter sinkt (CLAYTON et al., 2002), werden die Werte der Carrier in Relation zu den Werten der Wildtypen derselben Altersklasse bestimmt. Dabei kann jedoch keine über die Monate fortschreitende Abnahme der relativen NMDAR-NR2B-Expression im Hippokampus der Carrier festgestellt werden. Da im Western-Blot allerdings nicht zwischen synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren unterschieden wird, ist nicht auszuschließen, dass es zu einer Abnahme synaptischer Rezeptoren kommt, die durch eine Hochregulation extrasynaptischer Rezeptoren maskiert wird. Extrasynaptische NMDAR können einen neuronalen Zelltod auslösen, während der Aktivierung synaptischer NMDAR die Induktion der Langzeitpotenzierung und neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden (BORDJI et al., 2011). Signifikante Änderungen der NMDAR-Expression finden sich allerdings nur bei Patienten mit definitiver Alzheimer-Diagnose, nicht aber bei einer leichten kognitiven Störung (SZE et al., 2001). Möglicherweise wird also im Tiermodell kein vergleichbar fortgeschrittenes Krankheitsstadium wie beim Menschen erreicht. In der Literatur wird die Bindungskapazität des NMDAR im Hippokampus und Kortex der Tg2576-Carrier gegenüber den Wildtypen als altersunabhängig unverändert beschrieben (CHA et al., 2001; KLINGNER et al., 2003). Überraschenderweise ist in der vorliegenden Studie im Alter von 8 und 10 Monaten eine bei

weiblichen Carriern geschlechtsspezifisch erhöhte NMDAR-NR2B-Rezeptorexpression zu verzeichnen. Oxidativer Stress ist eines der ersten pathologischen Kennzeichen der AK und scheint bei weiblichen Alzheimer-Patienten besonders ausgeprägt zu sein (SCHUESSEL et al., 2004). Somit könnte eine vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei den untersuchten Tieren geschlechtsspezifisch zu einer vorübergehenden Modulation der Rezeptorexpression geführt haben. Oxidativer Stress bedingt eine Hochregulation der NMDAR in Maushirn-Endothelzellen und eine Sensitivierung für glutamaterge Reize (BETZEN, 2010). Ob diese Erkenntnisse auch auf hippocampale Zelllinien übertragbar sind und ob im Tg2576-Modell analog zu Alzheimer-Patienten tatsächlich geschlechtsspezifische Unterschiede in der ROS-Bildung vorliegen, werden weitere Untersuchungen klären müssen. Insbesondere stellt sich die Frage, worauf sich die unterschiedliche NMDAR-Expression im Mausmodell und Menschen begründet.

Weiterhin spielen auch die metabotropen Glutamat-Rezeptoren bei der synaptischen Plastizität im hippocampalen Netzwerk eine Rolle. In der vorliegenden Studie sind keine mit dem Alter fortschreitenden Veränderungen der Expression des metabotropen Glutamat-Rezeptors 5 (mGluR5) der Carrier in Relation zu den Wildtypen zu sehen. Übereinstimmend damit werden sowohl die mRNA-Expression als auch die Oberflächenexpression des mGluR5 im Hippokampus bei jungen und alten Tg2576-Mäusen als unverändert beschrieben (CHA et al., 2001; KLINGNER et al., 2003). Allerdings zeigt sich in der vorliegenden Studie eine selektive Erhöhung der mGluR5-Expression bei den 12 Monate alten weiblichen Carriern. Dieser geschlechtsspezifischen Beobachtung sollten weitere Untersuchungen folgen, insbesondere da vermutlich eine funktionelle Verbindung zwischen mGluR und NMDAR besteht. Nach TAKAGI et al. (2012) können mGluR5 die NMDAR-NR2B-Aktivität im Hippokampus über Phosphorylierung regulieren und einen NMDA-induzierten Zelltod weiter verstärken. Post mortem Studien am Hippokampus von Alzheimer-Patienten zeigen eine reduzierte mGluR1-Expression und eine erhöhte mGluR2-Expression. Über mGluR5 fehlen bislang noch an menschlichen Gehirnen erhobene Daten (REVETT et al., 2012).

Auch die untersuchte PBR-Expression weist mit zunehmendem Alter keine progressive Veränderung auf. Lediglich im Alter von 12 Monaten sind bei männlichen Carriern höhere Werte als bei den Wildtypen, den anderen Altersgruppen und den weiblichen Carriern feststellbar. Der PBR ist bekannt für seine Expression in aktivierten Mikroglia und Astrozyten. Eine erhöhte PBR-Expression kann somit auf neuroinflammatorische Vorgänge hindeuten, wie sie auch im Rahmen der AK auftreten. So stellen JI et al. (2008) bei 20 Monate alten APP23-Mäusen eine besonders hohe PBR-Akkumulation im Hippokampus und

entorhinalen Kortex fest. Eine Studie an Gehirnen von Alzheimer-Patienten zeigt jedoch, dass die PBR-Bindungskapazität im Hippokampus zwar sehr hoch ist, aber keine Signifikanz gegenüber den ebenfalls hohen Werten der gesunden Kontrollpersonen erreicht. Eine signifikante Erhöhung ist im Thalamus und im temporalen und parietalen Kortex zu sehen (GULYAS et al., 2009). Analog dazu kann mittels Positronen-Emissions-Tomographie bereits bei Patienten mit früher dementieller Erkrankung in vivo ein erhöhtes PBR-Bindungspotential für radioaktiv markierte PBR-Liganden in zahlreichen Hirnregionen nachgewiesen werden, nicht aber im medialen Temporallappen inklusive des Hippokampus (YASUNO et al., 2008). Somit wird PBR-Liganden eine Rolle als potentielle Biomarker für Entzündungsreaktionen und reaktive Gliose im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen zugesprochen. Daneben gibt es auch zahlreiche Hinweise auf neuroprotektive und antiinflammatorische Effekte spezifischer PBR-Liganden, so dass diese in Zukunft möglicherweise Bedeutung bei der Behandlung der AK erlangen könnten (RUPPRECHT et al., 2010). Angesichts dessen erscheint eine Ausweitung der Untersuchung der PBR-Expression im Tg2576-Mausmodell auf weitere Hirnregionen in Folgestudien von besonderem Interesse.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse im Western-Blot, dass das transgene Tg2576-Mausmodell vermutlich nicht sämtliche pathologische Merkmale abbildet wie sie beim Alzheimer-Patienten angenommen werden. Das Zustandekommen der verzeichneten geschlechtsspezifischen Differenzen im glutamatergen System (NMDAR-NR2B-Expressionserhöhung bei 8 und 10 Monate alten weiblichen Carriern; mGluR5-Expressionserhöhung bei 12 Monate alten weiblichen Carriern) sollte mit einer größeren Probenzahl in weiteren Studien analysiert werden. Ergänzend sollten künftig nicht nur weitere Gehirnareale im Mausmodell auf veränderte geschlechtsspezifische Rezeptorexpressionen untersucht werden, auch die gewonnenen Daten von Alzheimer-Patienten sollten eingehend unter dem Aspekt des Geschlechts analysiert werden.

#### **4.2.7 Abschließende Betrachtung und Ausblick**

In der vorliegenden Studie bestätigt sich die insgesamt vielversprechende Stellung des Mausmodells Tg2576 in der Alzheimer-Forschung. Im modifizierten Hole-Board-Test weisen die transgenen Tiere altersabhängig kognitive Beeinträchtigungen, disinhibitorische Tendenzen und – erstmals beschrieben – auch feinmotorische Störungen auf. Die deutlichen Unterschiede zu den Kontrolltieren erleichtern es, in zukünftigen Studien therapeutische Effekte beurteilen zu können.

Insbesondere unterstreicht diese Studie die Wichtigkeit, Tiere des Tg2576-Modells getrennt nach ihrem Geschlecht zu erfassen. Sollen dagegen geschlechtsunabhängige Untersuchungen durchgeführt werden, zeigt sich, dass eine Entscheidung für weibliche Tiere mehrere Vorteile bietet. Neben dem praktischen Aspekt, dass die weiblichen Tiere in Gruppen gehalten werden können, weisen diese bei gleichzeitig niedrigerer Mortalität im Vergleich zu den männlichen transgenen Tieren stärkere kognitive Beeinträchtigungen auf. Insgesamt ist die vorliegende Studie ein erster Schritt zu einer umfassenden geschlechtsbezogenen Charakterisierung des Tg2576-Mausmodells. Ziel ist es, auf diesem Weg weitere Einblicke in die Entstehungsmechanismen der Alzheimer-Krankheit zu erlangen und geschlechtsbezogene therapeutische Angriffspunkte zur symptomatischen und letztendlich kausalen Bekämpfung dieser Krankheit untersuchen zu können.

Hierzu sind fraglos weiterführende Untersuchungen zu den geschlechtsspezifischen Differenzen und deren Ursachen mit Hilfe histologischer und weiterer biochemischer Methoden vonnöten.

## 5 Zusammenfassung

### **„Phänotypische Charakterisierung eines transgenen Mausmodells der Alzheimer-Krankheit unter Bezug auf Alter und Geschlecht“**

Die Alzheimer-Krankheit ist die häufigste Form der Demenz mit einer stetig steigenden Zahl Betroffener. Trotz intensiver Forschung sind die genauen Ursachen noch immer weitgehend ungeklärt, mit der Folge, dass bislang keine kausale Therapie zur Verfügung steht. Als einer der vermuteten Risikofaktoren gilt das Geschlecht – Frauen erkranken häufiger und mit insgesamt schwererem Verlauf an Alzheimer als Männer.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, das transgene Mausmodell Tg2576, das ein humanes Amyloid-Vorläuferprotein mit der schwedischen Doppelmutation überexprimiert, phänotypisch umfassend zu charakterisieren und auf geschlechtsspezifische Differenzen hin zu untersuchen. Dabei werden jeweils sechs männliche und sechs weibliche Träger des Transgens (Carrier) im Alter von 6, 8, 10, 12, 14 und 16 Monaten mit ihren gesunden Wurfgeschwistern (Wildtypen) verglichen. Die Tiere werden im modifizierten Hole-Board-Test über acht Tage auf kognitive, verhaltensbedingte und motorische Parameter untersucht. Ab einem Alter von 8 bis 10 Monaten weisen die Carrier im Gegensatz zu den Wildtypen progressive, signifikante Beeinträchtigungen des deklarativen Gedächtnisses und des Arbeitsgedächtnisses auf. Damit einhergehend können eine verstärkte Anwendung nicht-räumlicher Suchstrategien sowie disinhibitorische Verhaltenstendenzen beobachtet werden. Im Geschlechtervergleich sind die kognitiven Defizite der weiblichen Carrier signifikant stärker ausgeprägt. Weiterhin zeigen sich ab einem Alter von 10 Monaten geschlechtsunabhängige, progressiv fortschreitende feinmotorische Störungen beim Fressen der Belohnungsmandeln. Die Mortalität der männlichen Carrier (48,4 %) ist signifikant höher im Vergleich zu den weiblichen Carrier (25,4 %) ( $p = 0,005$ ). Die weibliche Tiere weisen ein signifikant niedrigeres Gewicht als die männliche Tiere auf ( $p < 0,001$ ), wobei die Carrier signifikant weniger wiegen als die Wildtypen ( $p < 0,001$ ). Laboranalysen zeigen im Geschlechtervergleich einen höheren Testosterongehalt im Blutserum der männlichen Tiere und einen höheren Östradiolgehalt bei den weiblichen Tieren. Bei der Untersuchung auf mögliche zugrundeliegende Störungen der Neurotransmission können keine mit zunehmendem Alter progressiven Veränderungen der Expression spezifischer Rezeptoren (NMDAR-NR2B, mGluR5 und PBR) im Western-Blot gezeigt werden.

Insgesamt erweist sich das Tg2576-Modell als ein vielversprechendes Modell der Alzheimer-Krankheit für die weitere Grundlagenforschung und präklinische Testung therapeutischer Strategien. Dabei ist es insbesondere auch für weiterführende geschlechtsspezifische Forschungsansätze geeignet.

## 6 Summary

### **“Phenotypic characterization of a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease regarding age and gender”**

Alzheimer’s disease is the most common form of dementia and is accompanied by a growing prevalence. Despite intensive research activities, the underlying causes are still poorly understood and there is no causative treatment available. Gender has been proposed as a risk factor. Thus, women are said to develop Alzheimer’s disease more often and to experience a greater cognitive deterioration than men.

The aim of the present study is to phenotypically characterize the transgenic mouse model Tg2576 overexpressing the Swedish mutation of human amyloid precursor protein and to investigate its gender-specific differences. Six male and six female transgenic mice aged 6, 8, 10, 12, 14 and 16 months, respectively, are compared with their wild type littermates. Using the modified hole board test, cognitive processes in parallel with behavioral dimensions and motoric performance are evaluated in the course of eight days. Starting at an age of 8 to 10 months, transgenic mice, in contrast to wild type mice, develop progressive, significant deficits of declarative and working memory. These are accompanied by an increased use of nonspatial search strategies and disinhibitory tendencies. The gender comparison uncovers a significantly greater cognitive impairment of female mice. Besides, starting at the age of 10 months, a gender non-specific progressive decline of fine motor skills can be observed with eating the rewarded almonds. Mortality in male transgenic mice (48,4 %) is significantly higher than in female transgenic mice (25,4 %) ( $p = 0,005$ ). Furthermore, female mice have a significantly lower body weight than male mice ( $p < 0,001$ ) with transgenic mice weighting less than wild type mice ( $p < 0,001$ ). Laboratory analysis indicates that male mice have increased levels of serum testosterone and female mice increased levels of serum estradiol by gender comparison. Regarding the investigation of a possibly underlying malfunctioning neurotransmission system, no age-dependent progressive changes in specific receptor expression (NMDAR-NR2B, mGluR5 und PBR) can be detected by Western blotting.

Overall the Tg2576 model has proven to be a promising model of Alzheimer’s disease for preclinical pharmacological testing and to further investigate the basic disease mechanisms. At that, it is particularly suitable for further gender-specific research approaches.

## 7 Literaturverzeichnis

AALTEN P, VERHEY FR, BOZIKI M, BULLOCK R, BYRNE EJ, CAMUS V, CAPUTO M, COLLINS D, DE DEYN PP, ELINA K, FRISONI G, GIRTLE N, HOLMES C, HURT C, MARRIOTT A, MECOCCI P, NOBILI F, OUSSET PJ, REYNISH E, SALMON E, TSOLAKI M, VELLAS B, ROBERT PH

Neuropsychiatric syndromes in dementia. Results from the European Alzheimer Disease Consortium: part I

Dement Geriatr Cogn Disord 2007; 24:457-63

ADRIANI W, OGNIBENE E, HEULAND E, GHIRARDI O, CAPRIOLI A, LAVIOLA G

Motor impulsivity in APP-SWE mice: a model of Alzheimer's disease

Behav Pharmacol 2006; 17:525-33

ALBERDI E, SANCHEZ-GOMEZ MV, CAVALIERE F, PEREZ-SAMARTIN A, ZUGAZA JL, TRULLAS R, DOMERCQ M, MATUTE C

Amyloid beta oligomers induce Ca<sup>2+</sup> dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors

Cell Calcium 2010; 47:264-72

ALEXANDER G, HANNA A, SERNA V, YOUNKIN L, YOUNKIN S, JANUS C

Increased aggression in males in transgenic Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease

Behav Brain Res 2011; 216:77-83

ALZHEIMER'S ASSOCIATION

2012 Alzheimer's disease facts and figures

Alzheimers Dement 2012; 8:131-68

ALZHEIMER A

Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde

Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin 1907; 64:146-148

ALZHEIMER EUROPE

European Collaboration on Dementia. Prevalence of dementia in Europe

[www.alzheimer-europe.org/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe](http://www.alzheimer-europe.org/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe) (Internet)

Luxemburg, Stand: 10/2009

ANSARI MA, SCHEFF SW

Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex

J Neuropathol Exp Neurol 2010; 69:155-67

ANSARI MA, SCHEFF SW

NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression

Free Radic Biol Med 2011; 51:171-8

APELT J, SCHLIEBS R

Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology  
Brain Res 2001; 894:21-30

ATKINSON RC, SHIFFRIN RM

Human memory: A proposal system and its control processes, In: Spence KW und Spence JT (Hrsg.)

The Psychology of Learning and Motivation: Advances in Research and Theory  
Academic Press, New York, 1968; 89-195

AUSSCHUSS FÜR AUSBILDUNG UND TIERGERECHTE HALTUNG DER GV-SOLAS  
- GESELLSCHAFT FÜR VERSUCHSTIERKUNDE

Planung und Struktur von Versuchstierbereichen tierexperimentell tätiger Institutionen  
GV-SOLAS, Biberach a.d. Riss, 4. überarbeitete Aufl. 1988

BADDELEY AD

The episodic buffer: a new component of working memory?

Trends Cogn Sci 2000; 4:417-423

BADDELEY AD

Working memory: looking back and looking forward

Nat Rev Neurosci 2003; 4:829-39

BADDELEY AD, BUENO O, CAHILL L, FUSTER JM, IZQUIERDO I, MCGAUGH JL,  
MORRIS RG, NADEL L, ROUTTENBERG A, XAVIER G, DA CUNHA C

The brain decade in debate: I. Neurobiology of learning and memory

Braz J Med Biol Res 2000; 33:993-1002

BADDELEY AD, HITCH GJ

Working memory, In: Bower GA (Hrsg.)

The Psychology of Learning and Motivation: Advances in Research and Theory  
Academic Press, New York, 1974; 47-89

BALLARD C, GAUTHIER S, CORBETT A, BRAYNE C, AARSLAND D, JONES E

Alzheimer's disease

Lancet 2011; 377:1019-31

BARNES LL, WILSON RS, BIENIAS JL, SCHNEIDER JA, EVANS DA, BENNETT DA

Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology

Arch Gen Psychiatry 2005; 62:685-91

BETZEN C

Oxidativer Stress als Modulator der NMDA-Rezeptorexpression auf zerebrovaskulären  
Endothelzellen

Dissertation, Mainz, 2010

BICKEL H

Epidemiologie und Gesundheitsökonomie, In: Wallesch C-W und Förstl H (Hrsg.)

Demenzen

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005; 1-15

BICKEL H

Das Wichtigste - Informationsblätter. Die Epidemiologie der Demenz  
www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01\_2012.pdf (Internet)  
Deutsche Alzheimer Gesellschaft e. V. Selbsthilfe Demenz, Berlin, Stand: 09/2012

BIRBAUMER N, SCHMIDT RF

Lernen und Gedächtnis, In: Schmidt RF, Lang F und Heckmann M (Hrsg.)  
Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie  
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010; 201-217

BITAN G, KIRKITADZE MD, LOMAKIN A, VOLLERS SS, BENEDEK GB, TEFLOW DB

Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways  
Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:330-5

BLISS TV, LOMO T

Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path  
J Physiol 1973; 232:331-56

BORDJI K, BECERRIL-ORTEGA J, BUISSON A

Synapses, NMDA receptor activity and neuronal Abeta production in Alzheimer's disease  
Rev Neurosci 2011; 22:285-94

BORRAS C, GAMBINI J, GOMEZ-CABRERA MC, SASTRE J, PALLARDO FV, MANN GE, VINA J

17beta-oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NFkappaB cascade  
Aging Cell 2005; 4:113-8

BRAAK H, BRAAK E

Neuropathological staging of Alzheimer-related changes  
Acta Neuropathol 1991; 82:239-59

BUCHNER A

Funktionen und Modelle des Gedächtnisses, In: Karnath H-O und Thier P (Hrsg.)  
Neuropsychologie  
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006; 437-447

BURGESS N, HITCH G

Computational models of working memory: putting long-term memory into context  
Trends Cogn Sci 2005; 9:535-41

BURNETTE WN

"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A  
Anal Biochem 1981; 112:195-203

BUTTERFIELD DA, SULTANA R

- Methionine-35 of abeta(1-42): importance for oxidative stress in Alzheimer disease  
J Amino Acids 2011; 198430:4
- BYERS SL, WILES MV, DUNN SL, TAFT RA  
Mouse estrous cycle identification tool and images  
PLoS One 2012; 7:13
- CACUCCI F, YI M, WILLS TJ, CHAPMAN P, O'KEEFE J  
Place cell firing correlates with memory deficits and amyloid plaque burden in Tg2576  
Alzheimer mouse model  
Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:7863-8
- CAI Z, ZHAO B, RATKA A  
Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease  
Neuromolecular Med 2011; 13:223-50
- CALABRESE P, MARKOWITSCH HJ  
Gedächtnis und Gehirn - Neurobiologische Korrelate von Gedächtnisstörungen  
Fortschr Neurol Psychiatr 2003; 71:211-9
- CALKINS MJ, MANCZAK M, MAO P, SHIRENDEB U, REDDY PH  
Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal  
mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease  
Hum Mol Genet 2011; 20:4515-29
- CALLAHAN MJ, LIPINSKI WJ, BIAN F, DURHAM RA, PACK A, WALKER LC  
Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice  
Am J Pathol 2001; 158:1173-7
- CARLSON GA, BORCHELT DR, DAKE A, TURNER S, DANIELSON V, COFFIN JD,  
ECKMAN C, MEINERS J, NILSEN SP, YOUNKIN SG, HSIAO KK  
Genetic modification of the phenotypes produced by amyloid precursor protein  
overexpression in transgenic mice  
Hum Mol Genet 1997; 6:1951-9
- CARROLL JC, ROSARIO ER, KREIMER S, VILLAMAGNA A, GENTZSCHEIN E,  
STANCZYK FZ, PIKE CJ  
Sex differences in beta-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid  
hormone exposure  
Brain Res 2010; 17:233-45
- CHA JH, FARRELL LA, AHMED SF, FREY A, HSIAO-ASHE KK, YOUNG AB,  
PENNEY JB, LOCASCIO JJ, HYMAN BT, IRIZARRY MC  
Glutamate receptor dysregulation in the hippocampus of transgenic mice carrying mutated  
human amyloid precursor protein  
Neurobiol Dis 2001; 8:90-102
- CHAPMAN PF, WHITE GL, JONES MW, COOPER-BLACKETER D, MARSHALL VJ,  
IRIZARRY M, YOUNKIN L, GOOD MA, BLISS TV, HYMAN BT, YOUNKIN SG,  
HSIAO KK  
Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice

Nat Neurosci 1999; 2:271-6

CHAPMAN RM, MAPSTONE M, GARDNER MN, SANDOVAL TC, MCCRARY JW, GUILLILY MD, REILLY LA, DEGRUSH E

Women have Farther to Fall: Gender Differences Between Normal Elderly and Alzheimer's Disease in Verbal Memory Engender Better Detection of Alzheimer's Disease in Women

J Int Neuropsychol Soc 2011; 13:1-9

CHEN CH, ZHOU W, LIU S, DENG Y, CAI F, TONE M, TONE Y, TONG Y, SONG W

Increased NF-kappaB signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease

Int J Neuropsychopharmacol 2012; 15:77-90

CLAYTON DA, MESCHES MH, ALVAREZ E, BICKFORD PC, BROWNING MD

A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat

J Neurosci 2002; 22:3628-37

CLINTON LK, BILLINGS LM, GREEN KN, CACCAMO A, NGO J, ODDO S, MCGAUGH JL, LAFERLA FM

Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice

Neurobiol Dis 2007; 28:76-82

CORCORAN KA, LU Y, TURNER RS, MAREN S

Overexpression of hAPP<sup>sw</sup> impairs rewarded alternation and contextual fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease

Learn Mem 2002; 9:243-52

CORDER EH, GHEBREMEDHIN E, TAYLOR MG, THAL DR, OHM TG, BRAAK H

The biphasic relationship between regional brain senile plaque and neurofibrillary tangle distributions: modification by age, sex, and APOE polymorphism

Ann N Y Acad Sci 2004:24-8

COUNTS SE, CHE S, GINSBERG SD, MUFSON EJ

Gender differences in neurotrophin and glutamate receptor expression in cholinergic nucleus basalis neurons during the progression of Alzheimer's disease

J Chem Neuroanat 2011; 42:111-7

D'AMELIO M, CAVALLUCCI V, MIDDEI S, MARCHETTI C, PACIONI S, FERRI A, DIAMANTINI A, DE ZIO D, CARRARA P, BATTISTINI L, MORENO S, BACCI A, AMMASSARI-TEULE M, MARIE H, CECCONI F

Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease

Nat Neurosci 2011; 14:69-76

D'MELLO GD, STECKLER T

Animal models in cognitive behavioural pharmacology: an overview

Brain Res Cogn Brain Res 1996; 3:345-52

DE FELICE FG, VELASCO PT, LAMBERT MP, VIOLA K, FERNANDEZ SJ, FERREIRA ST, KLEIN WL

Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine  
J Biol Chem 2007; 282:11590-601

DE QUERVAIN DJ, AERNI A, SCHELLING G, ROOZENDAAL B  
Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease  
Front Neuroendocrinol 2009; 30:358-70

DE QUERVAIN DJ, ROOZENDAAL B, MCGAUGH JL  
Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory  
Nature 1998; 394:787-90

DE STROOPER B, SAFTIG P, CRAESSAERTS K, VANDERSTICHELE H, GUHDE G, ANNAERT W, VON FIGURA K, VAN LEUVEN F  
Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein  
Nature 1998; 391:387-90

DEACON RM, CHOLERTON LL, TALBOT K, NAIR-ROBERTS RG, SANDERSON DJ, ROMBERG C, KOROS E, BORNEMANN KD, RAWLINS JN  
Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice  
Behav Brain Res 2008; 189:126-38

DEACON RM, KOROS E, BORNEMANN KD, RAWLINS JN  
Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests  
Behav Brain Res 2009; 197:466-8

DEMURO A, SMITH M, PARKER I  
Single-channel Ca(2+) imaging implicates Abeta1-42 amyloid pores in Alzheimer's disease pathology  
J Cell Biol 2011; 195:515-24

VAN DER MEER M, BAUMANS V, OLIVIER B, VAN ZUTPHEN BL  
Impact of transgenic procedures on behavioral and physiological responses in postweaning mice  
Physiol Behav 2001; 73:133-43

VAN DER STAAY FJ  
Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy  
Brain Res Rev 2006; 52:131-59

VAN DER STAAY FJ, ARNDT SS, NORDQUIST RE  
Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders  
Behav Brain Funct 2009; 5:11

VAN DER STAAY FJ, GIELING ET, PINZON NE, NORDQUIST RE, OHL F  
The appetitively motivated "cognitive" holeboard: a family of complex spatial discrimination tasks for assessing learning and memory  
Neurosci Biobehav Rev 2012; 36:379-403

DIXIT R, ROSS JL, GOLDMAN YE, HOLZBAUR EL

Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau  
Science 2008; 319:1086-9

DODART JC, BALES KR, GANNON KS, GREENE SJ, DEMATTOS RB, MATHIS C,  
DELONG CA, WU S, WU X, HOLTZMAN DM, PAUL SM  
Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's  
disease model  
Nat Neurosci 2002; 5:452-7

EDELMANN W, WITTMANN S  
Lernpsychologie  
Beltz Verlag, Weinheim, Basel, 7. überarbeitete Aufl. 2012

EICHENBAUM H, STEWART C, MORRIS RG  
Hippocampal representation in place learning  
J Neurosci 1990; 10:3531-42

ELDER GA, GAMA SOSA MA, DE GASPERI R  
Transgenic mouse models of Alzheimer's disease  
Mt Sinai J Med 2010; 77:69-81

ESCH FS, KEIM PS, BEATTIE EC, BLACHER RW, CULWELL AR, OLTERS DORF T,  
MCCLURE D, WARD PJ  
Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor  
Science 1990; 248:1122-4

FELICIO LS, NELSON JF, FINCH CE  
Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity  
and the duration of persistent vaginal cornification  
Biol Reprod 1984; 31:446-53

FILE SE, WARDILL AG  
Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board  
Psychopharmacologia 1975; 44:53-9

FINDER VH  
Alzheimer's disease: a general introduction and pathomechanism  
J Alzheimers Dis 2010; 3:5-19

GAMBLIN TC, CHEN F, ZAMBRANO A, ABRAHA A, LAGALWAR S, GUILLOZET  
AL, LU M, FU Y, GARCIA-SIERRA F, LAPOINTE N, MILLER R, BERRY RW, BINDER  
LI, CRYNS VL  
Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease  
Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:10032-7

GAMES D, ADAMS D, ALESSANDRINI R, BARBOUR R, BERTHELETTE P,  
BLACKWELL C, CARR T, CLEMENS J, DONALDSON T, GILLESPIE F, ET AL.  
Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid  
precursor protein  
Nature 1995; 373:523-7

GAMES D, BUTTINI M, KOBAYASHI D, SCHENK D, SEUBERT P  
Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer's disease  
J Alzheimers Dis 2006; 9:133-49

GAUGGEL S  
Was ist Kognition? Grundlagen und Methoden, In: Kircher T und Gauggel S (Hrsg.)  
Neuropsychologie der Schizophrenie  
Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2008; 12-18

GLASS CK, SAIJO K, WINNER B, MARCHETTO MC, GAGE FH  
Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration  
Cell 2010; 140:918-34

GLENNER GG, WONG CW  
Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel  
cerebrovascular amyloid protein  
Biochem Biophys Res Commun 1984; 120:885-90

GORDAN ML, JUNGWIRTH B, OHL F, KELLERMANN K, KOCHS EF, BLOBNER M  
Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in  
rats: A comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test  
Behav Brain Res 2012; 24:24

GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K, TUNG YC, QUINLAN M, WISNIEWSKI HM, BINDER  
LI  
Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer  
cytoskeletal pathology  
Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83:4913-7

GULYAS B, MAKKAI B, KASA P, GULYA K, BAKOTA L, VARSZEGI S, BELICZAI Z,  
ANDERSSON J, CSIBA L, THIELE A, DYRKS T, SUHARA T, SUZUKI K, HIGUCHI M,  
HALLDIN C  
A comparative autoradiography study in post mortem whole hemisphere human brain slices  
taken from Alzheimer patients and age-matched controls using two radiolabelled DAA1106  
analogues with high affinity to the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) system  
Neurochem Int 2009; 54:28-36

HAASS C, SCHLOSSMACHER MG, HUNG AY, VIGO-PELFREY C, MELLON A,  
OSTASZEWSKI BL, LIEBERBURG I, KOO EH, SCHENK D, TEFLOW DB, ET AL.  
Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism  
Nature 1992; 359:322-5

HALL CS, BALLACHEY EL  
A study of the rat's behavior in a field: A contribution to method in comparative psychology  
University of California Publications in Psychology 1932; 6:1-12

HALLIGAN PW, DAVID AS  
Cognitive neuropsychiatry: towards a scientific psychopathology  
Nat Rev Neurosci 2001; 2:209-15

HARDY J, SELKOE DJ

The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics  
Science 2002; 297:353-6

HARDY JA, HIGGINS GA  
Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis  
Science 1992; 256:184-5

HARRISON FE, HOSSEINI AH, MCDONALD MP  
Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks  
Behav Brain Res 2009; 198:247-51

HEBB DO  
The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory  
John Wiley and Sons, New York, 1949

HEBERT LE, BECKETT LA, SCHERR PA, EVANS DA  
Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050  
Alzheimer Dis Assoc Disord 2001; 15:169-73

HENSLEY K  
Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation  
J Alzheimers Dis 2010; 21:1-14

HERREMAN A, SERNEELS L, ANNAERT W, COLLEN D, SCHOONJANS L, DE STROOPER B  
Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells  
Nat Cell Biol 2000; 2:461-2

HERRUP K  
Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis  
J Neurosci 2010; 30:16755-62

HIGGINS GA, JACOBSEN H  
Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application  
Behav Pharmacol 2003; 14:419-38

HIRAI K, ALIEV G, NUNOMURA A, FUJIOKA H, RUSSELL RL, ATWOOD CS, JOHNSON AB, KRESS Y, VINTERS HV, TABATON M, SHIMOHAMA S, CASH AD, SIEDLAK SL, HARRIS PL, JONES PK, PETERSEN RB, PERRY G, SMITH MA  
Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease  
J Neurosci 2001; 21:3017-23

HODGES H  
Maze procedures: the radial-arm and water maze compared  
Brain Res Cogn Brain Res 1996; 3:167-81

HODGES JR

Alzheimer's centennial legacy: origins, landmarks and the current status of knowledge concerning cognitive aspects  
Brain 2006; 129:2811-22

HOLMES C, CUNNINGHAM C, ZOTOVA E, WOOLFORD J, DEAN C, KERR S, CULLIFORD D, PERRY VH  
Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease  
Neurology 2009; 73:768-74

HSIAO K, BORCHELT DR, OLSON K, JOHANNSDOTTIR R, KITT C, YUNIS W, XU S, ECKMAN C, YOUNKIN S, PRICE D, ET AL.  
Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins  
Neuron 1995; 15:1203-18

HSIAO K, CHAPMAN P, NILSEN S, ECKMAN C, HARIGAYA Y, YOUNKIN S, YANG F, COLE G  
Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice  
Science 1996; 274:99-102

HUITRON-RESENDIZ S, SANCHEZ-ALAVEZ M, GALLEGOS R, BERG G, CRAWFORD E, GIACCHINO JL, GAMES D, HENRIKSEN SJ, CRIADO JR  
Age-independent and age-related deficits in visuospatial learning, sleep-wake states, thermoregulation and motor activity in PDAPP mice  
Brain Res 2002; 928:126-37

HYND MR, SCOTT HL, DODD PR  
Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease  
J Neurochem 2004; 90:913-9

IADECOLA C, ZHANG F, NIWA K, ECKMAN C, TURNER SK, FISCHER E, YOUNKIN S, BORCHELT DR, HSIAO KK, CARLSON GA  
SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein  
Nat Neurosci 1999; 2:157-61

INOUE S  
In situ A $\beta$  pores in AD brain are cylindrical assembly of A $\beta$  protofilaments  
Amyloid 2008; 15:223-33

IQBAL K, GRUNDKE-IQBAL I  
Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention  
J Cell Mol Med 2008; 12:38-55

IRIZARRY MC, MCNAMARA M, FEDORCHAK K, HSIAO K, HYMAN BT  
APP<sup>Sw</sup> transgenic mice develop age-related A $\beta$  deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1  
J Neuropathol Exp Neurol 1997a; 56:965-73

IRIZARRY MC, SORIANO F, MCNAMARA M, PAGE KJ, SCHENK D, GAMES D, HYMAN BT

Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse  
J Neurosci 1997b; 17:7053-9

IRVINE K, LAWS KR, GALE TM, KONDEL TK

Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: A meta analysis  
J Clin Exp Neuropsychol 2012; 23:23

ITTNER LM, KE YD, DELERUE F, BI M, GLADBACH A, VAN EERSEL J, WOLFING H, CHIENG BC, CHRISTIE MJ, NAPIER IA, ECKERT A, STAUFENBIEL M, HARDEMAN E, GOTZ J

Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models  
Cell 2010; 142:387-97

IWATSUBO T, ODAKA A, SUZUKI N, MIZUSAWA H, NUKINA N, IHARA Y

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 1994; 13:45-53

JACOBSEN JS, WU CC, REDWINE JM, COMERY TA, ARIAS R, BOWLBY M, MARTONE R, MORRISON JH, PANGALOS MN, REINHART PH, BLOOM FE

Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease  
Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103:5161-6

JANUS C

Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze  
Learn Mem 2004; 11:337-46

JATURAPATPORN D, ISAAC MG, MCCLEERY J, TABEL N

Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease  
Cochrane Database Syst Rev 2012; 15

JI B, MAEDA J, SAWADA M, ONO M, OKAUCHI T, INAJI M, ZHANG MR, SUZUKI K, ANDO K, STAUFENBIEL M, TROJANOWSKI JQ, LEE VM, HIGUCHI M, SUHARA T

Imaging of peripheral benzodiazepine receptor expression as biomarkers of detrimental versus beneficial glial responses in mouse models of Alzheimer's and other CNS pathologies  
J Neurosci 2008; 28:12255-67

JIN JJ, KIM HD, MAXWELL JA, LI L, FUKUCHI K

Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease  
J Neuroinflammation 2008; 5:23

KABOGO D, RAUW G, AMRITRAJ A, BAKER G, KAR S

$\beta$ -amyloid-related peptides potentiate K<sup>+</sup>-evoked glutamate release from adult rat hippocampal slices  
Neurobiol Aging 2010; 31:1164-72

KANDEL ER

The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses  
Science 2001; 294:1030-8

KANG J, LEMAIRE HG, UNTERBECK A, SALBAUM JM, MASTERS CL, GRZESCHIK KH, MULTHAUP G, BEYREUTHER K, MULLER-HILL B

The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor  
Nature 1987; 325:733-6

KAWARABAYASHI T, YOUNKIN LH, SAIDO TC, SHOJI M, ASHE KH, YOUNKIN SG  
Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease

J Neurosci 2001; 21:372-81

KING DL, ARENDASH GW

Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months

Physiol Behav 2002; 75:627-42

KING DL, ARENDASH GW, CRAWFORD F, STERK T, MENENDEZ J, MULLAN MJ  
Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease

Behav Brain Res 1999; 103:145-62

KLINGNER M, APELT J, KUMAR A, SORGER D, SABRI O, STEINBACH J, SCHEUNEMANN M, SCHLIEBS R

Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology

Int J Dev Neurosci 2003; 21:357-69

KOBAYASHI DT, CHEN KS

Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease

Genes Brain Behav 2005; 4:173-96

KOENIGSKNECHT-TALBOO J, LANDRETH GE

Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines

J Neurosci 2005; 25:8240-9

KOFFIE RM, MEYER-LUEHMANN M, HASHIMOTO T, ADAMS KW, MIELKE ML, GARCIA-ALLOZA M, MICHEVA KD, SMITH SJ, KIM ML, LEE VM, HYMAN BT, SPIRES-JONES TL

Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques

Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:4012-7

KOKJOHN TA, ROHER AE

Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions

Alzheimers Dement 2009; 5:340-7

KRAEPELIN E

Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte  
Barth, Leipzig, 1910

KUPERSTEIN I, BROERSEN K, BENILOVA I, ROZENSKI J, JONCKHEERE W,  
DEBULPAEP M, VANDERSTEEN A, SEGERS-NOLTEN I, VAN DER WERF K,  
SUBRAMANIAM V, BRAEKEN D, CALLEWAERT G, BARTIC C, D'HOOGHE R,  
MARTINS IC, ROUSSEAU F, SCHYMKOWITZ J, DE STROOPER B

Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the  
Abeta42 to Abeta40 ratio  
Embo J 2010; 29:3408-20

KURIEN BT, SCOFIELD RH

Protein blotting: a review  
J Immunol Methods 2003; 274:1-15

LAEMMLI UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
Nature 1970; 227:680-5

LAGE JM

100 Years of Alzheimer's disease (1906-2006)  
J Alzheimers Dis 2006; 9:15-26

LALONDE R, LEWIS TL, STRAZIELLE C, KIM H, FUKUCHI K

Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity,  
anxiety, and motor coordination  
Brain Res 2003; 977:38-45

LEE HG, ZHU X, CASTELLANI RJ, NUNOMURA A, PERRY G, SMITH MA

Amyloid-beta in Alzheimer disease: the null versus the alternate hypotheses  
J Pharmacol Exp Ther 2007; 321:823-9

LESNE S, KOH MT, KOTILINEK L, KAYED R, GLABE CG, YANG A, GALLAGHER  
M, ASHE KH

A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory  
Nature 2006; 440:352-7

LESNE S, KOTILINEK L, ASHE KH

Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact  
memory function  
Neuroscience 2008; 151:745-9

LEWIS J, DICKSON DW, LIN WL, CHISHOLM L, CORRAL A, JONES G, YEN SH,  
SAHARA N, SKIPPER L, YAGER D, ECKMAN C, HARDY J, HUTTON M, MCGOWAN  
E

Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP  
Science 2001; 293:1487-91

LI S, JIN M, KOEGLSPERGER T, SHEPARDSON NE, SHANKAR GM, SELKOE DJ

Soluble Abeta oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors  
J Neurosci 2011; 31:6627-38

LIZ, JO J, JIA JM, LO SC, WHITCOMB DJ, JIAO S, CHO K, SHENG M  
Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization  
Cell 2010; 141:859-71

LIU F, DAY M, MUNIZ LC, BITRAN D, ARIAS R, REVILLA-SANCHEZ R, GRAUER S, ZHANG G, KELLEY C, PULITO V, SUNG A, MERVIS RF, NAVARRA R, HIRST WD, REINHART PH, MARQUIS KL, MOSS SJ, PANGALOS MN, BRANDON NJ  
Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory  
Nat Neurosci 2008; 11:334-43

LIU W, TANG Y, FENG J  
Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system  
Life Sci 2011; 89:141-6

LOWRY OH  
Protein measurement with the Folin phenol reagent  
J Biol Chem 1951; 193:265-275

LYNCH MA  
Long-term potentiation and memory  
Physiol Rev 2004; 84:87-136

MAIER W, SCHULZ JB, WEGGEN S, WOLF S  
Alzheimer & Demenzen verstehen. Diagnose, Behandlung, Alltag, Betreuung  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010

MANDELKOW EM, MANDELKOW E  
Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration  
Cold Spring Harb Perspect Med 2012; 2

MANLY JJ, MERCHANT CA, JACOBS DM, SMALL SA, BELL K, FERIN M, MAYEUX R  
Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women  
Neurology 2000; 54:833-7

MANSO Y, CARRASCO J, COMES G, ADLARD PA, BUSH AI, HIDALGO J  
Characterization of the role of the antioxidant proteins metallothioneins 1 and 2 in an animal model of Alzheimer's disease  
Cell Mol Life Sci 2012; 6:6

MARKOWITSCH HJ  
Dem Gedächtnis auf der Spur. Vom Erinnern und Vergessen  
Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 2002

MARKOWITSCH HJ

Das Gedächtnis. Entwicklung, Funktionen, Störungen  
C. H. Beck, München, 2009

MAYNARD CJ, CAPPAL R, VOLITAKIS I, CHERNY RA, MASTERS CL, LI QX, BUSH AI

Gender and genetic background effects on brain metal levels in APP transgenic and normal mice: implications for Alzheimer beta-amyloid pathology  
J Inorg Biochem 2006; 100:952-62

MCGOWAN E, PICKFORD F, KIM J, ONSTEAD L, ERIKSEN J, YU C, SKIPPER L, MURPHY MP, BEARD J, DAS P, JANSEN K, DELUCIA M, LIN WL, DOLIOS G, WANG R, ECKMAN CB, DICKSON DW, HUTTON M, HARDY J, GOLDE T

Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice  
Neuron 2005; 47:191-9

MIDDEI S, DANIELE S, CAPRIOLI A, GHIRARDI O, AMMASSARI-TEULE M  
Progressive cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease overexpressing mutant hAPP<sub>swe</sub>

Genes Brain Behav 2006; 5:249-56

MONACELLI AM, CUSHMAN LA, KAVCIC V, DUFFY CJ

Spatial disorientation in Alzheimer's disease: the remembrance of things passed  
Neurology 2003; 61:1491-7

MOOKHERJEE P, GREEN PS, WATSON GS, MARQUES MA, TANAKA K, MEEKER KD, MEABON JS, LI N, ZHU P, OLSON VG, COOK DG

GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model  
J Alzheimers Dis 2011; 26:447-55

MORINAGA A, ONO K, TAKASAKI J, IKEDA T, HIROHATA M, YAMADA M

Effects of sex hormones on Alzheimer's disease-associated beta-amyloid oligomer formation in vitro

Exp Neurol 2011; 228:298-302

MORLEY JE, FARR SA, BANKS WA, JOHNSON SN, YAMADA KA, XU L

A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory  
J Alzheimers Dis 2010; 19:441-9

MORRIS R

Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat  
J Neurosci Methods 1984; 11:47-60

MULLAN M, CRAWFORD F, AXELMAN K, HOULDEN H, LILIUS L, WINBLAD B, LANNFELT L

A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid

Nat Genet 1992; 1:345-7

MURPHY MP, LEVINE III H

Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide

J Alzheimers Dis 2010; 19:311-23

MUSTAFIZ T, PORTELIUS E, GUSTAVSSON MK, HOLTTA M, ZETTERBERG H, BLENNOW K, NORDBERG A, LITHNER CU

Characterization of the brain beta-amyloid isoform pattern at different ages of Tg2576 mice  
Neurodegener Dis 2011; 8:352-63

NELSON PT, ALAFUZOFF I, BIGIO EH, BOURAS C, BRAAK H, CAIRNS NJ, CASTELLANI RJ, CRAIN BJ, DAVIES P, DEL TREDICI K, DUYCKAERTS C, FROSCHE MP, HAROUTUNIAN V, HOF PR, HULETTE CM, HYMAN BT, IWATSUBO T, JELLINGER KA, JICHA GA, KOVARI E, KUKULL WA, LEVERENZ JB, LOVE S, MACKENZIE IR, MANN DM, MASLIAH E, MCKEE AC, MONTINE TJ, MORRIS JC, SCHNEIDER JA, SONNEN JA, THAL DR, TROJANOWSKI JQ, TRONCOSO JC, WISNIEWSKI T, WOLTJER RL, BEACH TG

Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature

J Neuropathol Exp Neurol 2012; 71:362-81

NUNOMURA A, PERRY G, ALIEV G, HIRAI K, TAKEDA A, BALRAJ EK, JONES PK, GHANBARI H, WATAYA T, SHIMOHAMA S, CHIBA S, ATWOOD CS, PETERSEN RB, SMITH MA

Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease

J Neuropathol Exp Neurol 2001; 60:759-67

O'KEEFE J

Place units in the hippocampus of the freely moving rat

Exp Neurol 1976; 51:78-109

ODDO S, CACCAMO A, SHEPHERD JD, MURPHY MP, GOLDE TE, KAYED R, METHERATE R, MATTSON MP, AKBARI Y, LAFERLA FM

Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction

Neuron 2003; 39:409-21

OGNIBENE E, MIDDEI S, DANIELE S, ADRIANI W, GHIRARDI O, CAPRIOLI A, LAVIOLA G

Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease

Behav Brain Res 2005; 156:225-32

OHL F

Testing for anxiety

Clinical Neuroscience Research 2003; 3:233-238

OHL F, FUCHS E

Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew

Brain Res Cogn Brain Res 1999; 7:379-87

OHL F, HOLSBOER F, LANDGRAF R

The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents

Behav Res Methods Instrum Comput 2001; 33:392-7

OHL F, KECK ME

Behavioural screening in mutagenised mice--in search for novel animal models of psychiatric disorders

Eur J Pharmacol 2003; 480:219-28

OHL F, OITZL MS, FUCHS E

Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage

J Neurosci Methods 1998; 81:35-40

OHL F, ROEDEL A, BINDER E, HOLSBOER F

Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice

Eur J Neurosci 2003; 17:128-36

OHNO M, SAMETSKY EA, YOUNKIN LH, OAKLEY H, YOUNKIN SG, CITRON M, VASSAR R, DISTERHOFT JF

BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease

Neuron 2004; 41:27-33

PAN XD, ZHU YG, LIN N, ZHANG J, YE QY, HUANG HP, CHEN XC

Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease

Mol Neurodegener 2011; 6:45

PASQUALETTI P, BONOMINI C, DAL FORNO G, PAULON L, SINFORIANI E, MARRA C, ZANETTI O, ROSSINI PM

A randomized controlled study on effects of ibuprofen on cognitive progression of Alzheimer's disease

Aging Clin Exp Res 2009; 21:102-10

PEICHL L

Die Augen der Säugetiere: Unterschiedliche Blicke in die Welt

Biologie in unserer Zeit 1997; 27:96-105

PERNECZKY R, DRZEZGA A, DIEHL-SCHMID J, LI Y, KURZ A

Gender differences in brain reserve : an (18)F-FDG PET study in Alzheimer's disease

J Neurol 2007; 254:1395-400

PIMPLIKAR SW

Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease

Int J Biochem Cell Biol 2009; 41:1261-8

PIMPLIKAR SW, NIXON RA, ROBAKIS NK, SHEN J, TSAI LH

Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis

J Neurosci 2010; 30:14946-54

PLANT LD, BOYLE JP, SMITH IF, PEERS C, PEARSON HA

The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons

J Neurosci 2003; 23:5531-5

PLATON; Schleiermacher FDE (Übers.)

Sämtliche Werke. Band 2

Lambert Schneider Verlag, 1940

POTTER PE, RAUSCHKOLB PK, PANDYA Y, SUE LI, SABBAGH MN, WALKER DG, BEACH TG

Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease

Acta Neuropathol 2011; 122:49-60

PUZZO D, PRIVITERA L, FA M, STANISZEWSKI A, HASHIMOTO G, AZIZ F, SAKURAI M, RIBE EM, TROY CM, MERCKEN M, JUNG SS, PALMERI A, ARANCIO O

Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory

Ann Neurol 2011; 69:819-30

QIU C, DE RONCHI D, FRATIGLIONI L

The epidemiology of the dementias: an update

Curr Opin Psychiatry 2007; 20:380-5

QUERFURTH HW, LAFERLA FM

Alzheimer's disease

N Engl J Med 2010; 362:329-44

REED-GEAGHAN EG, SAVAGE JC, HISE AG, LANDRETH GE

CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar Abeta-stimulated microglial activation

J Neurosci 2009; 29:11982-92

REED MN, HOFMEISTER JJ, JUNGBAUER L, WELZEL AT, YU C, SHERMAN MA, LESNE S, LADU MJ, WALSH DM, ASHE KH, CLEARY JP

Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived Abeta oligomers

Neurobiol Aging 2011; 32:1784-94

REIMAN EM, CHEN K, LIU X, BANDY D, YU M, LEE W, AYUTYANONT N, KEPPLER J, REEDER SA, LANGBAUM JB, ALEXANDER GE, KLUNK WE, MATHIS CA, PRICE JC, AIZENSTEIN HJ, DEKOSKY ST, CASELLI RJ

Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease

Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:6820-5

RENNER M, LACOR PN, VELASCO PT, XU J, CONTRACTOR A, KLEIN WL, TRILLER A

Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5

Neuron 2010; 66:739-54

REVETT TJ, BAKER GB, JHAMANDAS J, KAR S

Glutamate system, amyloid  $\beta$  peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology  
J Psychiatry Neurosci 2012; 37:110190

RINALDI P, POLIDORI MC, METASTASIO A, MARIANI E, MATTIOLI P, CHERUBINI A, CATANI M, CECCHETTI R, SENIN U, MECOCCI P  
Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease  
Neurobiol Aging 2003; 24:915-9

ROBERSON ED, HALABISKY B, YOO JW, YAO J, CHIN J, YAN F, WU T, HAMTO P, DEVIDZE N, YU GQ, PALOP JJ, NOEBELS JL, MUCKE L  
Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease  
J Neurosci 2011; 31:700-11

ROBERT PH, VERHEY FR, BYRNE EJ, HURT C, DE DEYN PP, NOBILI F, RIELLO R, RODRIGUEZ G, FRISONI GB, TSOLAKI M, KYRIAZOPOULOU N, BULLOCK R, BURNS A, VELLAS B  
Grouping for behavioral and psychological symptoms in dementia: clinical and biological aspects. Consensus paper of the European Alzheimer disease consortium  
Eur Psychiatry 2005; 20:490-6

ROBINSON SR  
Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease  
J Neurosci Res 2001; 66:972-80

ROOZENDAAL B  
Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation  
Psychoneuroendocrinology 2000; 25:213-38

ROSARIO ER, CHANG L, HEAD EH, STANCZYK FZ, PIKE CJ  
Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease  
Neurobiol Aging 2011; 32:604-13

ROTHMAN SM, MATTSON MP  
Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease  
Neuromolecular Med 2010; 12:56-70

RUPPRECHT R, PAPADOPOULOS V, RAMMES G, BAGHAI TC, FAN J, AKULA N, GROVER G, ADAMS D, SCHUMACHER M  
Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders  
Nat Rev Drug Discov 2010; 9:971-88

SASTRE M, WALTER J, GENTLEMAN SM  
Interactions between APP secretases and inflammatory mediators  
J Neuroinflammation 2008; 5:25

SATO T, DIEHL TS, NARAYANAN S, FUNAMOTO S, IHARA Y, DE STROOPER B, STEINER H, HAASS C, WOLFE MS

Active gamma-secretase complexes contain only one of each component  
J Biol Chem 2007; 282:33985-93

SAVE E, CRESSANT A, THINUS-BLANC C, POU CET B

Spatial firing of hippocampal place cells in blind rats  
J Neurosci 1998; 18:1818-26

SCARMEAS N, HADJIGEORGIOU GM, PAPADIMITRIOU A, DUBOIS B, SARAZIN M, BRANDT J, ALBERT M, MARDER K, BELL K, HONIG LS, WEGESIN D, STERN Y

Motor signs during the course of Alzheimer disease  
Neurology 2004; 63:975-82

SCHAEFFER EL, FIGUEIRO M, GATTAZ WF

Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models  
Clinics 2011; 1:45-54

SCHÄFER S, WIRTHS O, MULTHAUP G, BAYER TA

Gender dependent APP processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease  
J Neural Transm 2007; 114:387-94

SCHENK D, BARBOUR R, DUNN W, GORDON G, GRAJEDA H, GUIDO T, HU K, HUANG J, JOHNSON-WOOD K, KHAN K, KHOLODENKO D, LEE M, LIAO Z,

LIEBERBURG I, MOTTER R, MUTTER L, SORIANO F, SHOPP G, VASQUEZ N, VANDEVERT C, WALKER S, WOGULIS M, YEDNOCK T, GAMES D, SEUBERT P  
Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse

Nature 1999; 400:173-7

SCHLIEBS R, ARENDT T

The cholinergic system in aging and neuronal degeneration  
Behav Brain Res 2011; 221:555-63

SCHMIDT R, ASSEM-HILGER E, BENKE T, DAL-BIANCO P, DELAZER M, LADURNER G, JELLINGER K, MARKSTEINER J, RANSMAYR G, SCHMIDT H, STÖGMANN E, WANCATA J, WEHRINGER C

Geschlechtsspezifische Unterschiede der Alzheimer Demenz  
Neuropsychiatr 2008; 22:1-15

SCHRÖTER A, MERGL R, BURGER K, HAMPEL H, MOLLER HJ, HEGERL U

Kinematic analysis of handwriting movements in patients with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, depression and healthy subjects

Dement Geriatr Cogn Disord 2003; 15:132-42

SCHUESSEL K, LEUTNER S, CAIRNS NJ, MULLER WE, ECKERT A

Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain

J Neural Transm 2004; 111:1167-82

SELKOE DJ

Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy  
Physiol Rev 2001; 81:741-66

SELKOE DJ, WOLFE MS  
Presenilin: running with scissors in the membrane  
Cell 2007; 131:215-21

SEO JS, LEEM YH, LEE KW, KIM SW, LEE JK, HAN PL  
Severe motor neuron degeneration in the spinal cord of the Tg2576 mouse model of Alzheimer disease  
J Alzheimers Dis 2010; 21:263-76

SEUBERT P, VIGO-PELFREY C, ESCH F, LEE M, DOVEY H, DAVIS D, SINHA S, SCHLOSSMACHER M, WHALEY J, SWINDLEHURST C, ET AL.  
Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids  
Nature 1992; 359:325-7

SHANKAR GM, LI S, MEHTA TH, GARCIA-MUNOZ A, SHEPARDSON NE, SMITH I, BRETT FM, FARRELL MA, ROWAN MJ, LEMERE CA, REGAN CM, WALSH DM, SABATINI BL, SELKOE DJ  
Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory  
Nat Med 2008; 14:837-42

SHUMAKER SA, LEGAULT C, RAPP SR, THAL L, WALLACE RB, OCKENE JK, HENDRIX SL, JONES BN, 3RD, ASSAF AR, JACKSON RD, KOTCHEN JM, WASSERTHEIL-SMOLLER S, WACTAWSKI-WENDE J  
Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial  
Jama 2003; 289:2651-62

SIMARD AR, SOULET D, GOWING G, JULIEN JP, RIVEST S  
Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease  
Neuron 2006; 49:489-502

SINFORIANI E, CITTERIO A, ZUCHELLA C, BONO G, CORBETTA S, MERLO P, MAURI M  
Impact of gender differences on the outcome of Alzheimer's disease  
Dement Geriatr Cogn Disord 2010; 30:147-54

SLOANE PD, ZIMMERMAN S, SUCHINDRAN C, REED P, WANG L, BOUSTANI M, SUDHA S  
The public health impact of Alzheimer's disease, 2000-2050: potential implication of treatment advances  
Annu Rev Public Health 2002; 23:213-31

SNYDER EM, NONG Y, ALMEIDA CG, PAUL S, MORAN T, CHOI EY, NAIRN AC, SALTER MW, LOMBROSO PJ, GOURAS GK, GREENGARD P  
Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta

Nat Neurosci 2005; 8:1051-8

SOSCIA SJ, KIRBY JE, WASHICOSKY KJ, TUCKER SM, INGELSSON M, HYMAN B, BURTON MA, GOLDSTEIN LE, DUONG S, TANZI RE, MOIR RD  
The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide  
PLoS One 2010; 5

SPERLING G

The information available in brief visual presentations  
Psychological Monographs: General and Applied 1960; 74, Nr. 11:1-29

SPILLANTINI MG, BIRD TD, GHETTI B

Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies  
Brain Pathol 1998; 8:387-402

SQUIRE LR, KANDEL ER; Niehaus M (Übers.)

Gedächtnis. Die Natur des Erinnerns  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2. Aufl. 2009

SQUIRE LR, ZOLA SM

Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems  
Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:13515-22

STECKLER T, MUIR JL

Measurement of cognitive function: relating rodent performance with human minds  
Brain Res Cogn Brain Res 1996; 3:299-308

STERN Y

Cognitive reserve and Alzheimer disease  
Alzheimer Dis Assoc Disord 2006; 20:112-7

STEWART S, CACUCCI F, LEVER C

Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model  
J Alzheimers Dis 2011; 26:105-26

STOWASSER JM, PETSCHING M, SKUTSCH F

Lateinisch - deutsches Schulwörterbuch  
R. Oldenbourg Verlag, München, 1998

SULTANA R, PERLUIGI M, BUTTERFIELD DA

Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis  
Acta Neuropathol 2009; 118:131-50

SYDOW A, VAN DER JEUGD A, ZHENG F, AHMED T, BALSCHUN D, PETROVA O, DREXLER D, ZHOU L, RUNE G, MANDELKOW E, D'HOOGHE R, ALZHEIMER C, MANDELKOW EM

Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant

J Neurosci 2011; 31:2511-25

SZE C, BI H, KLEINSCHMIDT-DEMASTERS BK, FILLEY CM, MARTIN LJ  
N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease  
J Neurol Sci 2001; 182:151-9

TAKAGI N, BESSHOH S, MARUNOUCHI T, TAKEO S, TANONAKA K  
Metabotropic glutamate receptor 5 activation enhances tyrosine phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and NMDA-induced cell death in hippocampal cultured neurons  
Biol Pharm Bull 2012; 35:2224-9

TAMAGNO E, PAROLA M, GUGLIELMOTTO M, SANTORO G, BARDINI P, MARRA L, TABATON M, DANNI O  
Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis  
Free Radic Biol Med 2003; 35:45-58

TANILA H  
Wading pools, fading memories-place navigation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease  
Front Aging Neurosci 2012; 4:1

TERRY RD, MASLIAH E, SALMON DP, BUTTERS N, DETERESA R, HILL R, HANSEN LA, KATZMAN R  
Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment  
Ann Neurol 1991; 30:572-80

THAL DR, RUB U, ORANTES M, BRAAK H  
Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD  
Neurology 2002; 58:1791-800

TOMIC JL, PENSALFINI A, HEAD E, GLABE CG  
Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction  
Neurobiol Dis 2009; 35:352-8

TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications  
Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76:4350-4

TRUSHINA E, NEMUTLU E, ZHANG S, CHRISTENSEN T, CAMP J, MESA J, SIDDIQUI A, TAMURA Y, SESAKI H, WENGENACK TM, DZEJA PP, PODUSLO JF  
Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease  
PLoS One 2012; 7:29

TULVING E

Episodic and semantic memory, In: Tulving E und Donaldson W (Hrsg.)  
Organization of Memory  
Academic Press, New York, 1972; 381-403

VASSAR R, BENNETT BD, BABU-KHAN S, KAHN S, MENDIAZ EA, DENIS P,  
TEPLOW DB, ROSS S, AMARANTE P, LOELOFF R, LUO Y, FISHER S, FULLER J,  
EDENSON S, LILE J, JAROSINSKI MA, BIERE AL, CURRAN E, BURGESS T, LOUIS  
JC, COLLINS F, TREANOR J, ROGERS G, CITRON M  
Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane  
aspartic protease BACE  
Science 1999; 286:735-41

VEST RS, PIKE CJ  
Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease  
Horm Behav 2012; 19:19

VINA J, LLORET A  
Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of  
amyloid-beta peptide  
J Alzheimers Dis 2010; 20:S527-33

VITEK MP, BROWN CM, COLTON CA  
APOE genotype-specific differences in the innate immune response  
Neurobiol Aging 2009; 30:1350-60

VLAD SC, MILLER DR, KOWALL NW, FELSON DT  
Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease  
Neurology 2008; 70:1672-7

VLOEBERGHES E, VAN DAM D, FRANCK F, SERROYEN J, GEERT M, STAUFENBIEL  
M, DE DEYN PP  
Altered ingestive behavior, weight changes, and intact olfactory sense in an APP  
overexpression model  
Behav Neurosci 2008; 122:491-7

WANG HY, LEE DH, D'ANDREA MR, PETERSON PA, SHANK RP, REITZ AB  
beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity.  
Implications for Alzheimer's disease pathology  
J Biol Chem 2000; 275:5626-32

WANG PN, YANG CL, LIN KN, CHEN WT, CHWANG LC, LIU HC  
Weight loss, nutritional status and physical activity in patients with Alzheimer's disease. A  
controlled study  
J Neurol 2004; 251:314-20

WEBBER KM, CASADESUS G, ATWOOD CS, BOWEN RL, PERRY G, SMITH MA  
Gonadotropins: a cohesive gender-based etiology of Alzheimer disease  
Mol Cell Endocrinol 2007; 262:271-5

WEINGARTEN MD, LOCKWOOD AH, HWO SY, KIRSCHNER MW  
A protein factor essential for microtubule assembly

Proc Natl Acad Sci U S A 1975; 72:1858-62

WESSON DW, NIXON RA, LEVY E, WILSON DA  
Mechanisms of neural and behavioral dysfunction in Alzheimer's disease  
Mol Neurobiol 2011; 43:163-79

WESTERMAN MA, COOPER-BLACKETER D, MARIASH A, KOTILINEK L,  
KAWARABAYASHI T, YOUNKIN LH, CARLSON GA, YOUNKIN SG, ASHE KH  
The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's  
disease  
J Neurosci 2002; 22:1858-67

WESTMARK CJ, WESTMARK PR, BEARD AM, HILDEBRANDT SM, MALTER JS  
Seizure susceptibility and mortality in mice that over-express amyloid precursor protein  
Int J Clin Exp Pathol 2008; 1:157-68

WHISHAW IQ, TOMIE J  
Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes  
Physiol Behav 1996; 60:1191-7

WHITEHOUSE PJ, PRICE DL, STRUBLE RG, CLARK AW, COYLE JT, DELON MR  
Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain  
Science 1982; 215:1237-9

WILKINSON B, KOENIGSKNECHT-TALBOO J, GROMMES C, LEE CY, LANDRETH  
G  
Fibrillar beta-amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of  
respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia  
J Biol Chem 2006; 281:20842-50

WINKEL S, PETERMANN F, PETERMANN U  
Lernpsychologie  
Verlag Ferdinand Schöningh GmbH & Co. KG, Paderborn, 2006

WISOR JP, EDGAR DM, YESAVAGE J, RYAN HS, MCCORMICK CM, LAPUSTEA N,  
MURPHY GM, JR.  
Sleep and circadian abnormalities in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role  
for cholinergic transmission  
Neuroscience 2005; 131:375-85

WU HY, HUDRY E, HASHIMOTO T, KUCHIBHOTLA K, ROZKALNE A, FAN Z,  
SPIRES-JONES T, XIE H, ARBEL-ORNATH M, GROSSKREUTZ CL, BACSKAI BJ,  
HYMAN BT  
Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic  
simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation  
J Neurosci 2010; 30:2636-49

YASSINE N, LAZARIS A, DORNER-CIOSSEK C, DESPRES O, MEYER L, MAITRE M,  
MENSAH-NYAGAN AG, CASSEL JC, MATHIS C  
Detecting spatial memory deficits beyond blindness in tg2576 Alzheimer mice  
Neurobiol Aging 2013; 34:716-30

YASUNO F, OTA M, KOSAKA J, ITO H, HIGUCHI M, DORONBEKOV TK, NOZAKI S,  
FUJIMURA Y, KOEDA M, ASADA T, SUHARA T  
Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in Alzheimer's disease measured by  
positron emission tomography with [11C]DAA1106  
Biol Psychiatry 2008; 64:835-41

ZANDI PP, CARLSON MC, PLASSMAN BL, WELSH-BOHMER KA, MAYER LS,  
STEFFENS DC, BREITNER JC  
Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache  
County Study  
Jama 2002; 288:2123-9

ZHAO J, O'CONNOR T, VASSAR R  
The contribution of activated astrocytes to Abeta production: implications for Alzheimer's  
disease pathogenesis  
J Neuroinflammation 2011; 8:150

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Randomisierte Anordnung der drei markierten Zylinder im mHBT.....	36
Tabelle 2: Tastaturbefehle und deren Bedeutung im mHBT .....	37
Tabelle 3: Zusammensetzung der Proteaseinhibitoren-haltigen Lysepufferlösung .....	43
Tabelle 4: Mit bovinem Serumalbumin ermittelter Standard bei 620 nm Wellenlänge .....	44
Tabelle 5: Pipettierschema für Sammelgel und Trenngele .....	46
Tabelle 6: Pipettierschema des 1x Laufpuffers .....	47
Tabelle 7: Pipettierschema des 1x Transferpuffers .....	49
Tabelle 8: Übersicht über die Rezeptorproteine mit ihren jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern in den gewählten Verdünnungsstufen .....	50
Tabelle 9: Überleben und Sterblichkeit männlicher und weiblicher Carrier und Wildtypen...	53
Tabelle 10: Körpergewicht aller 24 Gruppen im mHBT .....	55
Tabelle 11: Östradiol- und Testosteron-Konzentration im Blutserum aller 24 Gruppen zum Todeszeitpunkt.....	59
Tabelle 12: Anzahl falsch besuchter Löcher aller 24 Gruppen im mHBT.....	62
Tabelle 13: Anzahl wiederholt besuchter Löcher aller 24 Gruppen im mHBT .....	66
Tabelle 14: Anzahl ausgelassener Löcher aller 24 Gruppen im mHBT.....	69
Tabelle 15: Benötigte Gesamtzeit aller 24 Gruppen im mHBT .....	72
Tabelle 16: Zeit bis zum ersten Betreten des Boards aller 24 Gruppen im mHBT.....	76
Tabelle 17: Anzahl der Boardbesuche aller 24 Gruppen im mHBT .....	79
Tabelle 18: Gesamtzeit auf dem Board aller 24 Gruppen im mHBT.....	80
Tabelle 19: Gesamtzeit der Immobilitätsphasen aller 24 Gruppen im mHBT .....	83
Tabelle 20: Gesamtzeit der Putzphasen aller 24 Gruppen im mHBT .....	84
Tabelle 21: Anzahl der besuchten richtigen Löcher aller 24 Gruppen im mHBT .....	85
Tabelle 22: Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine aller 24 Gruppen im mHBT .....	88
Tabelle 23: Anzahl der Linienüberschreitungen aller 24 Gruppen im mHBT.....	89
Tabelle 24: Benötigte Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung aller 24 Gruppen im mHBT.	90
Tabelle 25: Relative Schwärzungsintensität der Rezeptoren PBR, NMDAR-NR2B und mGluR5 im Hippokampus.....	93

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitliche Klassifikation des Gedächtnisses unter Vereinigung der Modelle nach ATKINSON und SHIFFRIN (1968) und BADDELEY und HITCH (1974) sowie inhaltliche Klassifikation des Langzeitgedächtnisses nach SQUIRE und ZOLA (1996) (modifiziert nach WINKEL et al. (2006, S. 36)).....	4
Abbildung 2: Modell des Langzeitgedächtnissystems mit involvierten Gehirnstrukturen (modifiziert nach SQUIRE und ZOLA (1996)) .....	5
Abbildung 3: Beeinflussung der Gedächtnisfunktionen durch Stresshormone (modifiziert nach DE QUERVAIN et al. (2009)) .....	7
Abbildung 4: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese als klassische Theorie zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit: Änderungen im A $\beta$ -Metabolismus lösen eine kaskadenartige Folge pathologischer Mechanismen aus, die zu Demenz führen (modifiziert nach HERRUP (2010)). .....	23
Abbildung 5: Einteilung der 24 Versuchstiere je Alterskohorte (6/8/10/12/14/16 Monate) in die 4 Untergruppen (weibliche Carrier, weibliche Wildtypen, männliche Carrier, männliche Wildtypen) .....	33
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines unmarkierten (links) und markierten (rechts) Zylinders im Querschnitt auf dem Hole-Board (Grafik: in Zusammenarbeit mit Daniel Klenk, München).....	35
Abbildung 7: Modifiziertes Hole-Board bestehend aus Versuchsarena und zentral liegendem Hole-Board mit den zehn aufgesteckten Zylindern .....	36
Abbildung 8: Zusammenfassende Darstellung untersuchbarer Parameter im mHBT (modifiziert nach OHL et al. (2003)).....	41
Abbildung 9: Darstellung des Mini-PROTEAN® Tetra Cell-Systems zur Gelelektrophorese	45
Abbildung 10: Schematische Darstellung wichtiger Komponenten der Gelelektrophorese: Sammelgel mit Geltaschen und Trenngel sowie Laufrichtung der Proteine .....	47
Abbildung 11: Darstellung des Mini Trans-Blot® Cell Moduls für den Proteintransfer (Blotting) .....	48
Abbildung 12: Schematische Darstellung des „Gel-Sandwiches“ beim Western-Blot-Verfahren.....	49
Abbildung 13: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) des Körpergewichts in Gramm (g) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT .....	56
Abbildung 14: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) des Körpergewichts in Gramm (g) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT .....	57
Abbildung 15: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Östradiol-Konzentration im Blutserum zum Todeszeitpunkt der weiblichen und männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C).....	60
Abbildung 16: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Anzahl falsch besuchter Löcher (Wrong Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT .....	64
Abbildung 17: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Anzahl falsch besuchter Löcher (Wrong Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT	65
Abbildung 18: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Anzahl wiederholt besuchter Löcher (Repeated Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten	

Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT .....	67
Abbildung 19: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Anzahl wiederholt besuchter Löcher (Repeated Choices) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT	68
Abbildung 20: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Anzahl ausgelassener Löcher (Omission Errors) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT.....	70
Abbildung 21: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Anzahl ausgelassener Löcher (Omission Errors) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT.....	71
Abbildung 22: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der benötigten Gesamtzeit (Time Trial) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT.....	73
Abbildung 23: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der benötigten Gesamtzeit (Time Trial) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT.....	74
Abbildung 24: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Zeit bis zum ersten Betreten des Boards (Latency First Board Entry) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT .....	77
Abbildung 25: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Zeit bis zum ersten Betreten des Boards (Latency First Board Entry) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT	78
Abbildung 26: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Gesamtzeit auf dem Board (Time on Board) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT.....	81
Abbildung 27: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der Gesamtzeit auf dem Board (Time on Board) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT.....	82
Abbildung 28: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der besuchten richtigen Löcher (Correct Hole Visits) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT .....	86
Abbildung 29: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der besuchten richtigen Löcher (Correct Hole Visits) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT	87
Abbildung 30: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der benötigten Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung (Time Food Intake) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller männlichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT .....	91
Abbildung 31: Vergleichende graphische Darstellung (MW $\pm$ SEM) der benötigten Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung (Time Food Intake) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten aller weiblichen Wildtypen (WT) und Carrier (C) im mHBT	92
Abbildung 32: Vergleichende graphische Darstellung (Median, 25 % und 75 % Perzentile) der Schwärzungsintensität des peripheren Benzodiazepin-Rezeptors (PBR) im Hippokampus der Carrier (C) in Relation zu den Wildtypen (WT) im Western-Blot.....	94
Abbildung 33: Vergleichende graphische Darstellung (Median, 25 % und 75 % Perzentile) der Schwärzungsintensität des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors mit NR2B-Untereinheit (NMDAR-NR2B) im Hippokampus der Carrier (C) in Relation zu den Wildtypen (WT) im Western-Blot .....	95

Abbildung 34: Vergleichende graphische Darstellung (Median, 25 % und 75 % Perzentile) der Schwärzungsintensität des metabotroper Glutamat-Rezeptors 5 (mGluR5) im Hippokampus der Carrier (C) in Relation zu den Wildtypen (WT) im Western-Blot ..... 96

## 10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ACh	Acetylcholin
AK	Alzheimer-Krankheit
AMPA	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoazol-Propionsäure
Aph-1	Anterior Pharynx-defective 1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APS	Ammoniumpersulfat
Aβ	Amyloid-beta
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β-Sekretase
BGBI	Bundesgesetzblatt
BPSD	neuropsychiatrische Demenzsymptome
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD14	Unterscheidungsgruppe 14
cm	Zentimeter
COOH	Carboxygruppe
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
F1	erste Filialgeneration
F2	zweite Filialgeneration
FELASA	Federation of Laboratory Animal Sciences Association
g	Gramm
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
h	Stunde
H <sub>2</sub> O dest.	destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HET	Hormonersatztherapie
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IL-1β	Interleukin 1β
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
mGluR5	metabotroper Glutamat-Rezeptor 5
mHBT	modifizierter Hole-Board-Test
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MW	Mittelwert
MWM	Morris-Water-Maze-Test
n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor kappa B
NFTs	Neurofibrillenbündel
ng	Nanogramm
NH <sub>2</sub>	Aminogruppe
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR-NR2B	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor mit NR2B-Untereinheit
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	nichtsteroidale Antiphlogistika
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBR	peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
Pde6b <sup>rd1</sup>	rd1-Mutation des Gens der $\beta$ -Untereinheit der Stäbchen-Phosphodiesterase 6
PDGF- $\beta$	Platelet-derived Growth Factor $\beta$
Pen-2	Präsenilin-Verstärker 2
pg	Pikogramm
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Präsenilin
PVC	Polycinylchlorid
rd1 <sup>+</sup>	homozygote Träger der Pde6b <sup>rd1</sup> -Mutation
rd1 <sup>-</sup>	nicht-homozygote Träger der Pde6b <sup>rd1</sup> -Mutation
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
sig.	signifikant
SOA	Superoxidanion
sog.	so genannt
TBS-T	Tween20-haltige Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethan-1,2-diamin
TierSchG	Tierschutzgesetz
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol.-%	Volumen-Prozent
vs.	gegenüber
z. B.	zum Beispiel

## 11 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. K. Matiasek vom Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als externe Arbeit zu betreuen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Phys. E. Kochs, Direktor der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München, danke ich für die Möglichkeit, die Studie an diesem Institut durchführen zu können.

Großer Dank gilt zugleich Herrn apl. Prof. Dr. med. M. Blobner, Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München, für die kritischen Anregungen und Hilfestellung bei der statistischen Bearbeitung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. Kristine Kellermann für ihren unermüdlichen Einsatz, die langjährige, ausgezeichnete Betreuung und den permanenten Rückhalt in allen Fragen bedanken. Ein herzlicher Dank geht auch an Frau Dr. med. Lucia Gordan für ihre große Hilfsbereitschaft und die anregenden Diskussionen. Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Rammes für die freundliche Beratung bedanken.

Ein großer Dank gilt allen meinen KollegInnen aus dem Mäuse- und Rattenstall für die gegenseitige Motivation, zudem Susan Vlachakis für die ausgezeichnete Einarbeitung und Franziska Hötzing, Johanna Walter, Martina Stigler und Julia Scheer für ihre großartige Unterstützung. Vielen Dank auch an Herrn Sepp Straßmair, der mir mit Rat und Tat bei allen organisatorischen Problemen im Laboralltag zur Seite stand.

Großer Dank gebührt ganz Rising Sun, Arne, Roly, Danny, Chris, Olaf, all meinen Kriechtieren, Vier-, Sechs- und Achtbeinern und allen anderen, die versucht haben, mir das notwendige Maß an Ablenkung zu verschaffen. Vielen lieben Dank an meine Freundin Conny für ihren jahrzehntelangen Beistand in allem, was ich mache.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die meine Tierliebe immer unterstützt haben, und die mir durch ihren finanziellen und seelischen Beistand das Studium der Tiermedizin und diese Arbeit erst ermöglicht haben.